

10/5563588

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

REC'D PCT/PTO 30 NOV 2004

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2003年12月11日 (11.12.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/102028 A1(51) 国際特許分類:
C12N 15/12, C07K 16/18, A61K 38/00

C07K 14/47,

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(21) 国際出願番号: PCT/JP03/00882

(22) 国際出願日: 2003年1月30日 (30.01.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2002-161400 2002年6月3日 (03.06.2002) JP
特願2002-214978 2002年7月24日 (24.07.2002) JP

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 岡部 英俊 (OKABE, Hidetoshi) [JP/JP]; 〒612-8017 京都府京都市伏見区桃山南大島町101-5 Kyoto (JP). 池川 志郎 (IKEGAWA, Shiro) [JP/JP]; 〒141-0021 東京都品川区上大崎1丁目12-22-201 Tokyo (JP).

規則4.17に規定する申立て:

— すべての指定国のための不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て (規則4.17(v))

(71) 出願人 および

(72) 発明者: 茶野 徳宏 (CHANO, Tokuhiko) [JP/JP]; 〒525-0027 滋賀県草津市野村5丁目9-34-809 Shiga (JP).

添付公開書類:

— 国際調査報告書
— 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て

(74) 代理人: 庄司 隆 (SHOJI, Takashi); 〒101-0032 東京都千代田区岩本町3丁目2番10号 SN岩本町ビル6階 Tokyo (JP).

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: RB1 GENE INDUCED PROTEIN (RB1CC1) AND GENE

(54) 発明の名称: RB1遺伝子誘導蛋白質 (RB1CC1) 及び遺伝子

(57) Abstract: It is intended to search for and provide a novel gene participating in multiple tolerance in cancer and its protein. It is also intended to clarify the functions of the gene and the protein and to provide a method of examining the gene and an antibody against the protein. It is further intended to provide a method of examining and diagnosing cancer by using the above gene and antibody. Thus, a novel protein (RB1CC1) or a polypeptide, which occurs in the nucleus of a human or animal cell and has a transcriptional function and/or a function of inducing the expression of retinoblastoma-1 gene (RB1 gene) or its gene product, and its gene are found out. Then the amino acid sequence and the cDNA sequence thereof are determined and the gene is amplified and detected with the use of primers hybridizable with the novel gene. Thus, the expression, mutation, etc. of the novel gene are examined and the relationship thereof with the proliferation of cancer cells is found out, thereby examining cancer. An antibody against the novel protein is prepared and the novel protein is detected by using the antibody. Thus, the relationship between the novel protein and the proliferation of cancer cells is found out, thereby examining cancer.

(57) 要約: 癌における多剤耐性に関与している新規遺伝子及びその蛋白質の検索・提供し、それら遺伝子及びその蛋白質の機能の解明し、該遺伝子の検査方法及び該蛋白質に対する抗体を提供し、上記の遺伝子及び抗体を用いて、癌の検査診断方法を提供するために、ヒト又は動物の細胞の核に存在し、転写因子機能及び/又はレチノブラストマー-1遺伝子 (RB1遺伝子) 或いはその遺伝子産物の発現を誘導しうる機能を有する新規蛋白質 (RB1CC1) 又はポリペプチド、及びその遺伝子を見出した。そのアミノ酸配列及びcDNA配列を決定し、新規遺伝子とハイブリダイズするプライマーにより、遺伝子の増幅、検出を行い、新規遺伝子の発現、変異等を検査し、癌細胞の増殖との関連を見出し癌の検査を行い、新規蛋白質に対する抗体を調製し、抗体による新規蛋白質の検出により、新規蛋白質と癌細胞の増殖との関連を見出し癌の検査を行った。

WO 03/102028 A1

明 細 書

RB1 遺伝子誘導蛋白質 (RB1CC1) 及び遺伝子

5 技術分野

本発明は、癌抑制遺伝子（レチノブラストーマ遺伝子：RB1 遺伝子）の発現を誘導しうる新規な蛋白質及びポリペプチド（以下新規蛋白質 RB1CC1）に関するものである。さらに詳しくは、新規蛋白質のアミノ酸配列の全部又は一部を有するポリペプチド、該ポリペプチドをコードする核酸（以下 RB1CC1 遺伝子）、該核酸を含有する組換えベクター、該組換えベクターで形質転換された形質転換体、該形質転換体を使ったペプチド又はポリペプチドの製造方法、該ペプチド又はポリペプチドに対する抗体、これらを利用した化合物のスクリーニング方法、該スクリーニングされた化合物、該ポリペプチド若しくは該核酸に作用する活性阻害化合物又は活性賦活化合物、これらに係する医薬組成物、及びこれらに係する疾病の検査診断方法並びに試薬に関する。

背景技術

抗がん剤の治療に抵抗性である多剤耐性（MDR）は癌治療を困難にさせている。MDR の成因は明確ではないが、いくつかの癌では MDR 関連遺伝子（MDR1 遺伝子）産物である P-糖蛋白質が関与していると言われている。一方、他の癌では P-糖蛋白質の発現が癌の発生や転移と逆に相関することも知られている。これらの P-糖蛋白質の異なる効果は異なる遺伝子産物の抑制を受けているか或いは異なった相互作用をしていると考えられる。MDR に関連する遺伝子の検索はこれらの現象を解明する上で必須である。

発明の開示

(解決しようとする課題)

本発明が解決しようとする課題は、上記のように抗がん剤に対する多剤耐性に関与する遺伝子及びその遺伝子産物を見いだすことである。より具体的には、本発明の課題は癌抑制遺伝子（レチノブラストーマ遺伝子:RB1 遺伝子）の発現を誘導しうる新規な蛋白質及びポリペプチド（新規蛋白質 RB1CC1）を提供することである。また本発明の別の課題は、新規蛋白質のアミノ酸配列の全部又は一部をコードする核酸（以下 RB1CC1 遺伝子）を提供し、遺伝子工学手法による、蛋白質又はポリペプチド（新規蛋白質 RB1CC1）の製造法を提供することである。さらに本発明の別の課題は、新規蛋白質 RB1CC1 由来のポリペプチドに対する抗体を提供することである。その他の本発明の課題は、上記のものを利用して新規蛋白質 RB1CC1 の有する作用の阻害剤・拮抗剤・賦活剤のスクリーニングをおこなうことであり、スクリーニングされた化合物を提供することであり、またこれらを利用した抗がん剤の治療に抵抗性である多剤耐性（MDR）の治療に用いる医薬組成物を提供することである。また別の本発明が解決しようとする課題は、本発明中で明らかになった、癌抑制遺伝子（レチノブラストーマ遺伝子:RB1 遺伝子）の発現を誘導しうる新規の蛋白質及びポリペプチド（RB1CC1 蛋白質）又は該蛋白質のアミノ酸配列の全部又は一部をコードする核酸（以下 RB1CC1 遺伝子）、これを検査することによって癌細胞又は癌の診断方法を提供することである。さらに、該蛋白質のアミノ酸配列の全部又は一部をコードする核酸を増幅しうる核酸プライマーを提供し、該プライマーを用いた核酸の増幅産物を検査することによる癌細胞又は癌の診断方法を提供することである。そして、該蛋白質又はポリペプチド（RB1CC1 蛋白質）と反応しうる抗体を提供することであり、またその抗体を用いた免疫学的

な検査方法を提供する。又本発明の課題は該検査方法に用いられる該プライマー又は該抗体を用いた検査試薬又はキットを提供することでもある。

5 (解決する手段)

課題解決のため、本発明者らは、U-2 OS 骨肉腫細胞と MDR 変異誘導細胞の間で別々に発現されている遺伝子を検索しその塩基配列及び該新規蛋白質の cDNA がコードするアミノ酸配列を決定した。また動物においても同様な蛋白質が存在することを証明するためマウスの新規蛋白質
10 のアミノ酸配列及び該新規蛋白質の cDNA がコードするアミノ酸配列を決定した。さらには、これらの蛋白質を認識する抗体を調製し、遺伝子の発現、変異、欠損等の検査に加えて免疫学的な検討を行い、ある種の癌細胞において本遺伝子の発現及び蛋白質の発現が抑制されていることを見出し、本発明を完成した。

15 すなわち、本発明は以下の構成よりなる。

- 1、ヒト又は動物の細胞の核に存在し、転写因子機能及び／又はレチノプラストーマ遺伝子 (RB1 遺伝子) 或いはその遺伝子産物の発現を誘導しうる機能を有する蛋白質又はポリペプチド。
- 2、上記 1 記載のヒト蛋白質が下記の群より選ばれるポリペプチド又は
20 蛋白質；(1) 配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列で示されるポリペプチド又は蛋白質、(2) 前記のポリペプチド又は蛋白質のアミノ酸配列の少なくとも 5 個のアミノ酸配列を含有するポリペプチド、(3) 前記のポリペプチド又は蛋白質と少なくとも約 70% のアミノ酸配列上の相同性を有するポリペプチド又は蛋白質、(4) 及び前記 (1) から (3)
25 のポリペプチド又は蛋白質のアミノ酸配列において 1 ないし数個のアミノ酸の欠失、置換又は付加などの変異あるいは誘発変異を有するポリペ

プチド又は蛋白質。

- 3、上記 1 記載の動物蛋白質がマウス由来の蛋白質であり、下記の群より選ばれるポリペプチド又は蛋白質；(1) 配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列で示されるポリペプチド又は蛋白質、(2) 前記のポリペプチド又は蛋白質のアミノ酸配列の少なくとも 5 個のアミノ酸配列を含有するポリペプチド、(3) 前記のポリペプチド又は蛋白質と少なくとも約 70% のアミノ酸配列上の相同性を有するポリペプチド又は蛋白質、(4) 及び前記 (1) から (3) のポリペプチド又は蛋白質のアミノ酸配列において 1 ないし数個のアミノ酸の欠失、置換又は付加などの変異あるいは誘発変異を有するポリペプチド又は蛋白質。
- 4、上記 1 ～ 3 に記載のポリペプチド又は蛋白質をコードする核酸又はその相補鎖。
- 5、上記 3 に記載の核酸又はその相補鎖とストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションする核酸。
- 15 6、配列表の配列番号 3 ～ 4 に記載の核酸又はその相補鎖の塩基配列のうち少なくとも 15 個の連続した塩基配列で示される核酸であって、該核酸の転写によって発現されるポリペプチドが上記 1 ～ 3 記載のポリペプチドである核酸。
- 7、上記 4 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の核酸を含有する組換えベクター。
- 20 8、上記 7 の組換えベクターで形質転換された形質転換体。
- 9、上記 8 の形質転換体を培養する工程を含む、上記 1 ～ 3 に記載のポリペプチド又は蛋白質の製造方法。
- 10、上記 4 ～ 6 に記載の核酸又はその相補鎖とストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションする配列表の配列番号 5 ～ 132 に記載
- 25 の核酸プライマー。
- 11、上記 1 ～ 3 に記載のポリペプチド又は蛋白質を免疫学的に認識す

る抗体。

- 1 2、上記 1 ～ 3 に記載のポリペプチド又は蛋白質の転写因子活性及び
／又は RB1 遺伝子の発現を誘導しうる機能を阻害もしくは増強する化
合物のスクリーニング方法であって、上記 1 ～ 3 に記載のポリペプチド
5 又は蛋白質、上記 1 1 に記載の抗体のうち、少なくともいずれか 1 つを
用いることを特徴とするスクリーニング方法。

- 1 3、上記 4 もしくは 6 に記載の核酸と相互作用して該核酸の発現を阻
害もしくは増強する化合物のスクリーニング方法であって、上記 4 ～ 6
のいずれか 1 項に記載の核酸、上記 7 に記載のベクター、上記 8 に記載
10 の形質転換体、上記 1 0 に記載の核酸プライマーのうち少なくともいずれ
れか 1 つを用いることを特徴とするスクリーニング方法。

- 1 4、上記 1 2 又は 1 3 に記載のスクリーニング方法でスクリーニング
される化合物。

- 1 5、上記 1 ～ 3 に記載のポリペプチド又は蛋白質の転写因子活性及び
15 ／又は RB1 遺伝子の発現を誘導しうる機能を阻害もしくは増強する化
合物。

- 1 6、上記 4 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の核酸と相互作用して該核酸の
発現を阻害もしくは増強する化合物。

- 1 7、上記 1 ～ 3 に記載のポリペプチド又は蛋白質、上記 4 ～ 6 のいず
20 れか 1 項に記載の核酸、上記 7 に記載のベクター、上記 8 に記載の形質
転換体、上記 1 0 に記載の核酸プライマー、上記 1 1 に記載の抗体、又
は上記 1 4 ～ 1 6 のいずれか 1 項に記載の化合物のうち、少なくともい
ずれか 1 つを含有することを特徴とする、抗がん剤の治療に抵抗性であ
る多剤耐性の治療に用いる医薬組成物。

- 25 1 8、上記 1 ～ 3 に記載のポリペプチド又は蛋白質の発現又は活性に関
連した疾病の検査診断方法であって、試料中の (a) 該ポリペプチド又

は蛋白質をコードしている核酸、及び／又は（b）該ポリペプチド又は蛋白質をマーカーとして分析することを含む検査診断方法。

19、癌細胞の検査方法又は癌の診断方法である上記18の検査診断方法。

5 20、上記11に記載の抗体を用いることを特徴とする、上記1～3に記載のポリペプチド又は蛋白質の全部又は一部の発現、増加、減少、欠損等を検査する上記18又は19に記載の方法。

21、上記10に記載の核酸プライマーの少なくとも何れかの1つを用いて上記1～3に記載のポリペプチド又は蛋白質をコードする遺伝子を増幅させる工程を経て、上記1～3に記載のポリペプチド又は蛋白質を
10 コードする遺伝子の全部又は一部の発現、変異、欠損又は挿入等を検査する上記18又は19に記載の方法。

22、癌抑制遺伝子レチノブラストーマ遺伝子（RB1 遺伝子）或いはその遺伝子産物（RB1 蛋白質）の全部又は一部の発現、増加、減少、変異、
15 欠損又は挿入等を検査することを組み合わせることを特徴とする上記18～21に記載の方法。

23、多剤耐性遺伝子、（MDR1 遺伝子）の或いはその遺伝子産物（MDR1 蛋白質：P-糖蛋白質）の全部又は一部の発現、増加、減少、変異、欠損又は挿入等を検査することを組み合わせることを特徴とする上記18～
20 22に記載の方法。

24、細胞増殖マーカー、Ki-67 蛋白質、の全部又は一部の発現、増加、減少等を検査することを組み合わせることを特徴とする上記18～23に記載の方法

25 25、上記23記載の方法を用いる癌細胞の薬剤感受性を検査する方法。

26、上記18～25に記載の方法に用いる検査診断試薬及びキット。

図面の簡単な説明

第 1 図は、ヒト RB1CC1 遺伝子と MDR1 遺伝子の発現の関連を調べたノーザンブロットの写真である。

第 2 図は、ヒト RB1CC1 蛋白質が核に存在していることを示すウエスタンブロットと細胞の免疫染色の写真である。

第 3 図は、マウス Rblcc1 蛋白質が核に存在していることを示すウエスタンブロットと細胞の免疫染色の写真である。

第 4 図は、抗癌剤ドキソルビシン処理による細胞増殖の効果を調べた図である。

10 第 5 図は、抗癌剤ドキソルビシン処理による細胞増殖と RB1CC1 遺伝子の発現と RB1 遺伝子の発現の関連を調べたノーザンブロットの写真である。

第 6 図は、各種癌細胞における RB1CC1 遺伝子の発現と RB1 遺伝子の発現の関連を調べた RT-PCR 産物の電気泳動写真である。

15 第 7 図は、ヒト各種臓器における RB1CC1 遺伝子の発現と RB1 遺伝子の発現の関連を調べたノーザンブロットの写真である。

第 8 図は、マウス各種臓器における RB1CC1 遺伝子の発現と RB1 遺伝子の発現の関連を調べたノーザンブロットの写真である。

第 9 図は、RB1CC1 遺伝子導入による RB1 遺伝子発現効果を調べた
20 RT-PCR 産物の電気泳動写真である。

第 10 図は、RB1 遺伝子プロモーター領域の転写活性に及ぼす RB1CC1 遺伝子誘導の効果を調べた結果の図である。

第 11 図は、各種の原発性乳癌における RB1CC1 遺伝子ローカスのヘテロ接合性の消失の検査結果の写真である。

25 第 12 図は、原発性乳癌における RB1CC1 遺伝子の変異を調べた RT-PCR 産物の電気泳動の写真と遺伝子配列解析結果の図である。

第 1 3 図は、原発性乳癌における RB1CC1 蛋白質と RB1 蛋白質の発現を調べたウエスタンブロットの写真である。

第 1 4 図は、原発性乳癌における RB1CC1 蛋白質と RB1 蛋白質の発現を調べた免疫組織染色の写真である。

- 5 第 1 5 図は、染色指標の RB1CC1 と、Ki-67 及び RB1 との相関を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

(新規蛋白質 RB1CC1)

- 10 本発明において提供される新規蛋白質 RB1CC1 をコードする核酸は、U-2 OS 骨肉腫細胞と MDR 変異誘導細胞の間で別々に発現されている遺伝子を検索し、配列表・配列番号 5 ～ 3 7 に記載の核酸プライマーを用いて、U-2 OS mRNA を鋳型として増幅し、その塩基配列及び該新規蛋白質の cDNA がコードするアミノ酸配列を決定し、新規なアミノ酸配
- 15 列を有する物質として、その cDNA が取得されたものである。本発明の新規蛋白質 RB1CC1 の cDNA は、6.6-kb の長さを持ち、4782 ヌクレオチドのオープンリーディングフレーム (ORF) を含み、分子量 180kDa の 1594 個のアミノ酸からなる蛋白質をコードしていた。

- 20 ヒト新規蛋白質 RB1CC1 はコンセンサス核局在シグナル配列部位 (リジン-プロリン-アルギニン-リジン配列: KPRK)、ロイシンジッパーモチーフ配列部位及びコイル-コイル構造を有していた。ヒト新規蛋白質 RB1CC1 は DNA 結合転写機能を持つことが示唆された。

(マウス新規蛋白質 Rb1cc1)

- 25 マウス筋肉の mRNA を鋳型にして配列表の配列番号 5 3 ～ 8 3 に記載の核酸プライマーを用いて増幅・解析した。得られたマウス新規蛋白質

質 Rb1cc1 をコードする cDNA は 6518bp の鎖長であり、1588 アミノ酸をコードしている 4764bp のオープンリーディングフレーム (ORF) を持っていた。マウス新規蛋白質 Rb1cc1 の遺伝子はヒト新規蛋白質 RB1CC1 遺伝子と 89% の相同性を持っていた。マウス新規蛋白質 Rb1cc1 もヒトと同様コンセンサス核局在シグナル配列部位 (リジン-プロリン-アルギニン-リジン配列: KPRK)、ロイシンジッパーモチーフ配列部位及びコイル-コイル構造を有していた。マウス新規蛋白質 Rb1cc1 も DNA 結合転写機能を持つことが示唆された。

10 (新規蛋白質及び遺伝子の機能)

MDR における本発明の RB1CC1 遺伝子の役割を調べるために、親細胞 U-2 OS 細胞、MDR に変異した細胞 (U-2 OS/DX580) と MDR1 遺伝子を導入した U-2 OS 細胞 (U-2/DOXO35) に対してドキソルビシン (doxorubicin) 処理をした場合の RB1CC1 遺伝子の発現を比較したところ、親細胞 U-2OS 細胞と遺伝子導入コントロール細胞 (U-2/Neo8) において、ドキソルビシン (doxorubicin) は RB1CC1 遺伝子の発現を低下させ、細胞死を誘導した。対照的に、MDR に変異した細胞においてはドキソルビシン (doxorubicin) 処理は RB1CC1 遺伝子の発現レベル、細胞生存期間又は細胞増殖に抑制効果を示さず、MDR1 遺伝子を有する細胞では RB1CC1 遺伝子の発現を増加させた。これらの細胞では RB1CC1 遺伝子の発現と RB1 遺伝子の発現が相関し、両遺伝子の発現はこれらの細胞の増殖を持続させた。

本発明の RB1CC1 遺伝子と RB1 遺伝子の発現の関係を調べるために、U-2 OS ヒト骨肉種細胞の 5 種の MDR への変異株と 24 種のヒト腫瘍細胞 (10 種の骨肉種、4 種の肺癌、7 種の乳癌、3 種の血液癌) での両遺伝子の発現を調べたところ、全ての細胞で RB1CC1 遺伝子の発現は RB1

遺伝子の発現と強く相関した。非腫瘍組織のノーザンブロット解析においても RB1CC1 遺伝子と RB1 遺伝子の発現は同様な相関を示した。

さらに、K562 細胞とジャーカット (Jurkat) 細胞において本発明の RB1CC1 遺伝子の外来性発現は RB1 遺伝子発現を増加させた。MDR1
5 遺伝子の発現はこれらの細胞では検出できなかった。RB1CC1 遺伝子の誘導は RB1 遺伝子のプロモーターの転写活性も刺激した。RB1CC1 遺伝子の導入は RB1 遺伝子のプロモーターの刺激活性を通じて RB1 遺伝子の発現を上昇させた。

新規蛋白質 RB1CC1 のアミノ酸配列、その核局在性及びその発現パターンから、本発明の RB1CC1 遺伝子は分子中間体を通して直接或いは間
10 接的に、RB1 遺伝子発現を増強させる転写因子である可能性がある。ヒト及びマウス由来 RB1 遺伝子のプロモーター配列の解析から Sp1 や ATF のような構成転写因子が存在する可能性は示されているが、RB1 遺伝子発現を直接制御する転写因子は知られていない。約 80% のヒトの
15 癌においては RB1 遺伝子経路に存在する分子がその発癌機構に関連しており、RB1 遺伝子の制御不能が多くの人々の癌に重要な役割をしている。

本発明のヒト及びマウスの RB1CC1 遺伝子は表 1 に示すようにヒトでは 74kb、マウスでは 57kb 以上の長さを有している 24 のエクソンと 23 個のイントロンから構成されている。そしてエクソン 3 の部位に翻
20 訳開始箇所がある。マウスにおけるこの遺伝子構造は、配列表・配列番号 84 ~ 132 に記載のプライマーを用いて明らかにした。この遺伝子の染色体上の局在部位を調べたところ、ヒトでは第 8 染色体上の 8q11.2 に、マウスでは第 1 染色体の 1A2-4 に存在していることがわかった。

(表 1)

表1 RB1CC1 遺伝子の構造

エキソン				イントロン				ヒトの配列			
番号	核酸鎖長 (bp)	番号	核酸鎖長 (kb)	スプライシング受容配列				スプライシング供与配列			
ヒト	マウス	ヒト	マウス								
1	358	288	1	9.1	11.2			GGTTGCCGG	glaagtgtcg		
2	115	110	2	1.3	1.8	tcttttccag	TTTTCTGAGT	GTGCCCTGACG	glaagtcaca		
3	122	115	3	1.4	3.5	tttcttcttag	TAACTGTATC	CAGTGCACAAC	glaagttgta		
4	127	127	4	0.2	0.1	ttttttgaag	TGTGGCAGAC	TGCTGGGACG	gtaggtattc		
5	171	171	5	7.0	3.8	aaaaatatag	GATACAAATC	GCTTGCAATG	glaagatata		
6	203	203	6	2.1	1.3	ttcaatatag	GAAATGTATG	AACTTACTCA	glatgtttgc		
7	430	427	7	5.7	3.8	gtatttttaag	TTTAGGAACT	TATGAGCAGG	glaagtaacg		
8	171	171	8	8.3	0.5	tgtcattttag	CTTGATCCAA	GCTTGCTCAG	gtaactattt		
9	195	185	9	0.3	0.2	tttctcaag	GGATTTTTTAG	TCAGACTGAA	glaagtgttt		
10	187	187	10	0.1	0.1	tattctctag	GTGGTGTGTC	CTACAGGGAG	glatgcaagt		
11	82	82	11	0.3	0.1	cctcttcttag	TGGGCTGGTG	AAATTTATTA	glaagttctc		
12	62	62	12	1.8	1.6	ctttatatacag	GGAACTCTTT	TTCCTTTTGT	glatgtattt		
13	104	104	13	0.8	0.3	tttggatag	ACTCAAAAGC	CATTCCCTCAG	glaaatgtca		
14	127	127	14	0.1	0.1	tctgtttcag	GGTTCCTTAA	TGAACAAAAG	gcaaattcaa		
15	1901	1892	15	10.1	10.0	tgttttccag	GCACTCTGTGA	TAGCAAAAAG	glaagaatta		
16	166	168	16	2.9	1.6	aattttgtaag	TCCTGCCATT	GGACAAACAG	gtctgtatct		
17	109	109	17	0.1	0.1	cttgttccag	ACCAATTTTA	CGGGATAAAG	gtttgtactg		
18	241	241	18	6.3	1.1	tgtcttccag	ATTGATAGA	TGTCGTGACA	glaagtatgg		
19	55	49	19	1.0	1.0	tcaacttttag	AGAAATATT	GTTAGAACGA	glaagtaaat		
20	48	48	20	4.4	3.0	ccacctgcaag	ACATTGCAAT	TCAAAAGACTG	glaagatttt		
21	59	59	21	2.3	2.1	tttttttttag	ATGCTCAGA	CTATTAGAGA	glaagatttt		
22	137	137	22	3.5	2.0	ctttatttccag	TTTTCAGGTG	GGTGAAGGTG	glaagtgta		
23	71	71	23	0.8	1.6	atttccattag	CTTCAGGTGC	AGCCAAAAG	glaaaaaaga		
24	1401	1379				tccctcttag	GCACAAAACA				

エキソン配列は大文字で、イントロン配列は小文字で示した。

11/1/11.

本発明の RB1CC1 遺伝子の変異を検出するために、35 例の原発性乳癌から調製した cDNA を用いて RB1CC1 遺伝子を解析したところ、7 例の癌で 9 種類の変異を確認した。9 種類全ての変異はエキソン 3 - 2 4 での抜け落ちの存在であり、断片化した新規蛋白質 RB1CC1 はコンセンサス核局在シグナル配列部位、ロイシンジッパーモチーフ配列部位及びコイルーコイル構造が失われており、基本的な新規蛋白質 RB1CC1 の機能がないものであった。

2 例の原発乳癌 (MMK3 と 6) では両方の対立遺伝子において複数のヘテロ接合体の抜け落ちがあり、抜け落ちを持つ RB1CC1 遺伝子からは明らかに断片化された新規蛋白質 RB1CC1 が得られることが予測される。MMK6 ではエキソン 3 - 2 4 (ヌクレオチド、534-5322) とエキ

15

20

25

ソン 9-23 (ヌクレオチド、1757-5187) での抜け落ちがあり、コドン 4 と 411 でそれぞれフレームシフトをしていた。MMK3 においては、エキソン 3-24 (ヌクレオチド、535-5324) とエキソン 5-11 (ヌクレオチド、849-2109) での抜け落ちがあり、前者ではコドン 4 での終止が起こり、後者ではコドン 109 でのフレームシフトを引き起こし 122 アミノ酸の断片蛋白が得られる結果になっていた。癌試料のゲノム DNA の PCR ではそれぞれの抜け落ち変異に対応する変則な生成物が検出されたのに対して、胚細胞 DNA では変異が認められないことから、これらの変異は体細胞で見出されるものである。これらの癌では新規蛋白質 RB1CC1 が検出されず、そして RB1 蛋白質が MMK6 では欠如しており、MMK3 では優位に減少していた。両方とも染色体の RB1 ローカスでのヘテロ接合性の消失はなかった。一方、RB1CC1 遺伝子の変異がない癌試料 (MMK12 と 29) では新規蛋白質 RB1CC1 と RB1 蛋白質の両方が存在していた。このことは RB1CC1 遺伝子の不活性化変異は RB1 遺伝子の発現を不十分にし、RB1 遺伝子経路の制御不能を促進し、そして癌発生を引き起こすことが示唆される。

5 例の他の乳癌 (MMK1、15、31、38 及び 40) においても、機能を持たない断片蛋白質を生成する RB1CC1 遺伝子内での抜け落ちを検出した。これらの変異は全てヘテロ接合体であったが、RB1CC1 ローカスでのヘテロ接合性の消失も存在しており、すべてのケースで RB1CC1 遺伝子の発現もないことより、両方の対立遺伝子で機能消失が起きていることが示唆された。これらの癌において RB1 蛋白質の発現が RB1CC1 遺伝子と RB1 遺伝子の変異がないケース (MMK12 と 29) に比較して明らかに減少していた。これらの 5 例 (MMK1、15、31、38 及び 40) では RB1 ローカスでのヘテロ接合性の消失は認められなかった。

本発明の RB1CC1 遺伝子のホモ接合不活性化は乳癌の発生に関連し

ている。調べた原発乳癌の約 20%において、明らかに機能を持たない断片の新規蛋白質 RB1CC1 を生成する RB1CC1 遺伝子の抜け落ち変異が認められた。これらの癌の 2 例は RB1CC1 遺伝子内部での複数のヘテロ接合の抜け落ちであり、残りは RB1CC1 遺伝子のヘテロ接合性の消失であった。7 例全てで新規蛋白質 RB1CC1 は検出できないが、RB1CC1 遺伝子の変異のない癌では蛋白質が発現されていた。RB1 蛋白質は RB1 ローカスでのヘテロ接合の消失がないにも拘わらず、7 例全てで存在しないか又は有意に減少していた。

新規蛋白質 RB1CC1 は RB1 遺伝子の発現を増加させる方向に制御しており、乳癌において RB1CC1 遺伝子は腫瘍抑制因子として働いている。そして、RB1CC1 遺伝子の異常・不活化は、RB1 遺伝子の発現低下をもたらし、癌の発生・進行を引き起こす。

上述のように RB1CC1 遺伝子及び蛋白質の発現が RB1 遺伝子の発現と相関していることから、本発明の RB1CC1 遺伝子及び蛋白質検査を RB1 遺伝子の発現又は蛋白質の発現と組み合わせて検査することによってより有用な癌細胞又は癌の診断方法が提供される。

さらに多剤耐性遺伝子 (MDR1) 又は蛋白質と組み合わせる検査によって、薬剤の癌又は癌細胞に対する効果を調べることができ、抗癌剤の選択、効果の予測に有用な検査方法又は診断方法が提供される。

20

(ポリペプチド又は蛋白質)

本発明の新規蛋白質は、配列表の配列番号 1 又は 2 に示すアミノ酸配列からなるポリペプチド又は蛋白質である。さらに本発明のポリペプチド又は蛋白質は、この配列表の配列番号 1 又は 2 に示すポリペプチドの部分配列を有するポリペプチドから選択される。その選択されるポリペプチドは、配列表の配列番号 1 又は 2 に示すポリペプチドと、好ましく

25

は約 70%以上、より好ましくは約 80%以上、さらに好ましくは約 90%をこえる相同性を有する。この相同性をもつポリペプチドの選択は、例えば RB1 遺伝子又は RB1 蛋白質の発現を指標にして行うことができる。

- アミノ酸配列の相同性を決定する技術は、自体公知であり、例えばア
- 5 ミノ酸配列を直接決定する方法、推定される核酸の塩基配列を決定後にコードされるアミノ酸配列を推定する方法等を使用することができる。

- 本発明のポリペプチドは、配列表の配列番号 1 又は 2 に示すアミノ酸配列からなるポリペプチド又は蛋白質の部分配列を有するポリペプチド
- 10 から選択されるアミノ酸配列を試薬・標準物質・免疫原として利用できる。その最小単位としては、少なくとも約 5 個以上、好ましくは少なくとも約 8~10 個以上、さらに好ましくは少なくとも約 11~15 個以上のアミノ酸で構成されるアミノ酸配列からなり、免疫学的にスクリーニングしうるポリペプチドを本発明の対象とする。

- 15 さらに、このように特定されたポリペプチドをもとにして、RB1 遺伝子又は RB1 蛋白質の発現を指標とすることにより、1 ないし数個のアミノ酸の欠失・置換・付加などの変異あるいは誘発変異を有するアミノ酸配列からなるポリペプチドも提供することができる。欠失・置換・付加あるいは挿入の手段は自体公知であり、例えば Ulmer の技術 (Science,
- 20 219:666, 1983) を利用することが出来る。さらに、これら利用できるペプチドは、その構成アミノ基もしくはカルボキシル基などを修飾するなど、機能の著しい変更を伴わない程度に改変が可能である。

- 本発明のポリペプチドは、それら自体で、新規蛋白質 RB1CC1 の機能を制御するための医薬組成物に使用できる。また、本発明のポリペプチ
- 25 ド又は蛋白質は、新規蛋白質 RB1CC1 の機能を制御しうる化合物、例えば、阻害剤、拮抗剤、賦活剤等を得るためのスクリーニングや、新規蛋

白質 RB1CC1 に対する抗体の取得に用いることができる。さらに、本発明のポリペプチド又は蛋白質は、試薬・標準品としても使用可能である。

(核酸)

- 5 本発明の核酸及びその相補鎖は、配列表の配列番号 1 又は 2 に記載のアミノ酸配列をコードする、配列表の配列番号 3 又は 4 に記載の核酸及び該核酸に対する相補鎖、これらの核酸とストリンジентな条件下でハイブリダイゼーションする核酸、及びこれらの核酸のうち少なくとも 15 個の連続した塩基配列を有しかつコードするペプチドが新規蛋白質
- 10 RB1CC1 に対する抗体と結合能を有する核酸を意味する。核酸として DNA を代表例にとると、「DNA にストリンジентな条件下でハイブリダイズする DNA」とは、自体公知の方法で例えば *Molecular Cloning: A laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) に記載の方法によって得ることができる。ここで、「ストリンジентな
- 15 条件下でハイブリタイズする」とは、例えば、6 × SSC、0.5% SDS 及び 50%ホルムアミドの溶液中で 42℃にて加温した後、0.1 × SSC、0.5% SDS の溶液中で 68℃にて洗浄する条件でも依然として陽性のハイブリタイズのシグナルが観察されることを表す。

- 本発明の核酸は、配列表の配列番号 1 又は 2 に記載のアミノ酸配列を
- 20 コードする、配列表の配列番号 3 又は 4 の核酸の情報から選択される相同鎖及び相補鎖を意味し、指定されたヌクレオチド配列の領域に対応する少なくとも約 15~20 個以上の配列からなる核酸配列及び該相補鎖を意味する。この有用な核酸配列の決定は、公知の蛋白質発現系、例えば無細胞蛋白質発現系を利用して簡易に発現蛋白質の確認を行い、その生
- 25 理活性新規蛋白質 RB1CC1 に対する抗体との結合性を指標にして選別することにより行うことができる。無細胞蛋白質発現系としては、例え

ば胚芽、家兎網状赤血球等由来のリボソーム系の技術を利用できる
(Nature, 179, 160~161, 1957)。

これらの核酸は、いずれも本発明の新規蛋白質 RB1CC1 及び本発明の
ポリペプチド又は蛋白質の製造に有用な遺伝子情報を提供するものであ
5 り、これらをコードする遺伝子等の核酸、又は mRNA 検出のためのプ
ローブもしくはプライマーとして、あるいは遺伝子発現を制御するため
のアンチセンスオリゴマーとして使用することができる。さらに、本発
明の核酸は、核酸に関する試薬・標準品としても利用できる。

10 (形質転換体)

上記のような無細胞蛋白質発現系以外にも、大腸菌、酵母、枯草菌、
昆虫細胞、動物細胞等の自体公知の宿主を利用した遺伝子組換え技術に
よって、本発明からなる新規蛋白質 RB1CC1 及びその由来物からなるポ
リペプチドを提供可能である。

15 形質転換は、自体公知の手段を応用することができ、例えばレプリコ
ンとして、プラスミド、染色体、ウイルス等を利用して宿主の形質転換
を行う。より好ましい系としては、遺伝子の安定性を考慮するならば、
染色体内へのインテグレート法があげられるが、簡便には核外遺伝子を
用いた自律複製系を利用する。ベクターは、宿主の種類により選択され、
20 発現目的の遺伝子配列と複製そして制御に関する情報を担持した遺伝子
配列とを構成要素とする。構成要素は宿主が原核細胞か真核細胞かによ
って選択し、プロモーター、リボソーム結合部位、ターミネーター、シ
グナル配列、エンハンサー等を自体公知の方法によって組み合わせて使
用する。

25 形質転換体は、自体公知の各々の宿主の培養条件に最適な条件を選択
して培養することにより、本発明のポリペプチドの製造に用いることが

できる。培養は、発現産生される新規蛋白質 RB1CC1 及びその由来物からなるポリペプチドの生理活性、特に RB1 遺伝子誘導活性又は DNA 結合性転写因子活性を指標にして行ってもよいが、培地中の形質転換体量を指標にして継代培養又はバッチによって行う。

5

(新規蛋白質 RB1CC1 及びその由来物の回収)

培地からの新規蛋白質 RB1CC1 及びその由来物からなるポリペプチドの回収は、新規蛋白質 RB1CC1 に対する抗体との結合性を指標にして、分子篩、イオンカラムクロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラ
10 フィー等を組み合わせるか、溶解度差にもとづく硫酸、アルコール等の分画手段によっても精製回収できる。

(抗体)

抗体は、本発明の新規蛋白質 RB1CC1 及びその由来物からなるポリペ
15 プチドの抗原決定基を選別し、作成する。抗原決定基は、少なくとも5個、より好ましくは少なくとも8～10個のアミノ酸で構成される。このアミノ酸配列は、必ずしも配列表の配列番号1又は2と相同である必要はなく、蛋白質の立体構造上の外部への露出部位であればよく、露出部位が不連続部位であれば、該露出部位について連続的なアミノ酸配列で
20 あることも有効である。抗体は、免疫学的に新規蛋白質 RB1CC1 及びその由来物からなるポリペプチドを認識する限り特に限定されない。この認識の有無は、公知の抗原抗体結合反応によって決定する。

抗体を産生するためには、本発明の新規蛋白質 RB1CC1 及びその由来物からなるポリペプチドを、アジュバントの存在又は非存在下で、単
25 又は担体に結合して、動物に対して体液性応答及び／又は細胞性応答等の免疫誘導を行う。担体は、自身が宿主に対して有害作用をおこさなけ

れば特に限定されず、例えばセルロース、重合アミノ酸、アルブミン等が例示される。免疫する動物としては、マウス、ラット、兎、やぎ、馬等が好適に用いられる。ポリクローナル抗体は、自体公知の血清からの抗体回収法によって取得する。

- 5 モノクローナル抗体を生産するためには、上記の免疫手段が施された動物から抗体産生細胞を回収し、自体公知の永久増殖性細胞への形質転換手段を導入することによって行われる。

- ポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体は、直接本発明からなる新規蛋白質 RB1CC1 と結合し、その活性を制御可能であり、新規蛋白質
- 10 RB1CC1 と RB1 遺伝子又は蛋白質の発現の制御を容易に行うことができる。そのため、RB1 遺伝子産物と新規蛋白質 RB1CC1 が関連する疾患の治療・予防のために有用である。

(スクリーニング)

- 15 かくして調製された新規蛋白質 RB1CC1 及びその由来物からなるポリペプチド、これらをコードする核酸及びその相補鎖、これらのアミノ酸配列及び塩基配列の情報に基づき形質転換させた細胞、並びに新規蛋白質 RB1CC1 及びその由来物からなるポリペプチドを免疫学的に認識する抗体は、単独又は複数手段を組み合わせることによって、新規蛋白質
- 20 RB1CC1 及びその由来物からなるポリペプチドとの結合性、新規蛋白質 RB1CC1 の機能、又は新規蛋白質 RB1CC1 の発現に対する阻害剤もしくは賦活剤のスクリーニングに有効な手段を提供する。すなわち、本発明のポリペプチド、本発明の抗体の少なくともいずれか1つを用いることで、本発明のポリペプチド又は蛋白質と RB1 遺伝子又は蛋白質の発
- 25 現を阻害もしくは増強する化合物を得るためのスクリーニング方法が、本発明の核酸、本発明のベクター、本発明の形質転換体、本発明の抗体

の少なくともいずれか1つを用いることで本発明の核酸と相互作用し該核酸の発現を阻害もしくは増強する化合物のスクリーニング方法が、本発明のポリペプチド又は蛋白質、本発明の抗体の少なくともいずれか1つを用いることで本発明のポリペプチド又は蛋白質の RB1 遺伝子又は蛋白質の発現制御機能を阻害もしくは増強する化合物のスクリーニング方法が提供可能である。例えば、ポリペプチドの立体構造に基づくドラッグデザインによる拮抗剤の選別、蛋白質発現系を利用した遺伝子レベルでの発現調整剤の選別、抗体を利用した抗体認識物質の選別等が、自体公知の医薬品スクリーニングシステムにおいて利用可能である。

10

(化合物、医薬組成物)

上記のスクリーニング方法で得られた化合物は、新規蛋白質 RB1CC1 及びその由来物からなるポリペプチドの RB1 遺伝子又は蛋白質の発現制御機能を調節する阻害剤、拮抗剤、賦活剤等の候補化合物として利用可能である。また、遺伝子レベルでの新規蛋白質 RB1CC1 及びその由来物からなるポリペプチドの発現に対する阻害剤、拮抗剤、賦活剤等の候補化合物としても利用可能である。上記の阻害剤、拮抗剤、賦活剤等の候補化合物としては、蛋白質、ポリペプチド、抗原性を有さないポリペプチド、低分子化合物等が挙げられ、好ましくは低分子化合物である。

かくして選別された候補化合物は、生物学的有用性と毒性のバランスを考慮して選別することによって、骨肉腫、白血病、更に、乳腺、前立腺、肺、及び大腸由来の腫瘍等の治療に用いる医薬組成物として調製可能である。また、本発明からなる新規蛋白質 RB1CC1 及びその由来物からなるポリペプチド、これらをコードする核酸及びその相補鎖、これらの塩基配列を含むベクター並びに、新規蛋白質 RB1CC1 及びその由来物からなるポリペプチドを免疫学的に認識する抗体は、それら自体が、新

規蛋白質 RB1CC1 と RB1 遺伝子産物との相互作用に対する阻害・拮抗・賦活等の機能を有する、乳癌、前立腺癌等の治療に用いる医薬手段として使用できる。ここで、乳癌、前立腺癌等とは、良性腫瘍ならびに悪性腫瘍を含み、なお、製剤化にあたっては、自体公知のポリペプチド、蛋白質、核酸、抗体等、各対象に応じた製剤化手段を導入すればよい。

本発明からなる新規蛋白質 RB1CC1 及びその由来物からなるポリペプチド、これらをコードする核酸及びその相補鎖、これらの塩基配列を含むベクター並びに、新規蛋白質 RB1CC1 及びその由来物からなるポリペプチドを免疫学的に認識する抗体は、本発明のポリペプチドの発現又はその活性が関連する疾患、例えば、本発明の新規蛋白質 RB1CC1 の発現又は RB1 遺伝子又はその産物との相互作用に関連した疾患等の検査診断方法として使用することができる。特に、乳癌、前立腺癌等の診断マーカー及び／又は試薬等の検査診断方法として有用である。診断は、新規蛋白質 RB1CC1 をコードしている核酸配列との相互作用・反応性を利用して、相応する核酸配列の存在量を決定すること、及び／又は新規蛋白質 RB1CC1 について生体内分布を決定すること、及び／又は新規蛋白質 RB1CC1 の試料中での存在量を決定することによって行う。詳しくは、新規蛋白質 RB1CC1 を診断マーカーとして検定する。その測定法は、自体公知の抗原抗体反応系、酵素反応系、PCR 反応系等を利用すればよい。さらに、検査診断の方法に用いる試薬キットなども含まれる。

(実施例)

以下、本発明を実施例に基づき具体的に説明するが、本発明は下記の実施例に限定されない。

(実施例 1 ヒト RB1CC1 の cDNA)

MDRに関連する遺伝子を同定するために、U-2 OS 骨肉腫細胞と MDR 変異誘導細胞の間で別々に発現されている遺伝子を検索し新規ヒト遺伝子を同定した。配列表の配列番号 5 と 26 のプライマー対 (CC1-S1 及び CC1-AS1) 及び配列番号 6 と 25 のプライマー対 (CC1-S2 及び CC1-AS2) を用いてクローニングし、更に配列番号 7 ～ 24 のプライマーを使ってその核酸配列を決定した。また、市販の cDNA 末端配列迅速増幅キット (RACE キット、ロッシュ社製) を用い、配列番号 27 ～ 37 のプライマーを使って、5'末端及び 3'末端 cDNA の配列を同定した。DNA とそのコードされるアミノ酸配列は DNAsis ver.3.2 シーケンスアナライザー (日立ソフトウェア製) と PSORT II (<http://www.yk.rim.or.jp/~aisoai/molbio-j.html>) を用いて解析した。その結果、その cDNA は、6.6-kb の長さを持ち、4782 ヌクレオチドのオープンリーディングフレーム (ORF) を含み、180kDa の分子量で 1594 個のアミノ酸からなる蛋白質をコードしていた。

15

(実施例 2 マウス Rblcc1 の cDNA)

マウス筋肉の mRNA を鋳型に RT-PCR 法を用いて増幅させ、配列表の配列番号 53 と 73 のプライマー対 (MCC1-S1 及び MCC1-AS1) 及び配列番号 54 と 72 のプライマー対 (MCC1-S2 及び MCC1-AS2) を使ってクローニングした。そして更に配列表・配列番号 55 ～ 71 のプライマーを使ってその核酸配列を決定した。また、配列表の配列番号 74 ～ 77 のプライマー (MCC-ASR1、MCC-ASR2、MCC-ASR3 及び INTRON1ASR) を 5'末端 RACE 用プライマー、配列番号 78 ～ 83 のプライマー (MCC-SR1、MCC-SR2、MCC3-S3、MCC3-S4、MCC3-AS2 及び MCC3-AS3) を 3'末端 RACE 用プライマーとして cDNA の迅速増幅を行った以外は実施例 1 と同様に操作してマウス新規蛋白質 Rblcc1

の cDNA を同定した。マウス新規蛋白質 Rb1cc1 をコードする cDNA は 6518bp の鎖長であり、1588 アミノ酸をコードしている 4764bp のオープンリーディングフレーム (ORF) を持っている。マウス新規蛋白質 Rb1cc1 の遺伝子はヒト新規蛋白質 RB1CC1 遺伝子と、核酸レベルにて 86%、蛋白レベルにて 89% の相同性を持っていた (配列番号 1 ~ 4 参照)。

(実施例 3 本発明の RB1CC1 遺伝子と MDR1 遺伝子の分析)

親細胞 U-2 OS 細胞と数種の MDR 変異細胞における RB1CC1 遺伝子と MDR1 遺伝子の発現レベルをノーザンブロットで解析した。RB1CC1 遺伝子の解析用プローブは RB1CC1 遺伝子配列のヌクレオチド番号 4190~4654 の間にハイブリダイズするものを用い、MDR1 遺伝子には MDR1 遺伝子のヌクレオチド番号 834~1119 にハイブリザイズするプローブを用いた。プローブはデオキシシトシン-3-リン酸の α 位のリンを放射性同元素に置換した α -32P-dCTP でラベルして用いた。グリセロアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素 (GAPDH) を mRNA 発現の指標として用いた。その結果両遺伝子の発現レベルは逆相関した (第 1 図)。

(実施例 4 抗体の調製とウエスタンブロット解析)

本発明の新規蛋白質 RB1CC1 のアミノ酸配列 642~658 (RB1CC-642)、744~757 (RB1CC-744) 及び 1104~1118 (RB1CC-1104) の 3 種類の合成ポリペプチドを調製し、それぞれのポリペプチドのアミノ末端にシステイン残基を導入したものを、ウサギに通常の方法で免疫し抗体を得た。U-2 OS 細胞の核成分と細胞質成分をそれぞれ SDS-PAGE 後、調製した抗体を用いてウエスタンブロットによる解析を行った。その結果、分子量 180kDa の RB1CC1 蛋白質が核に存在していることが示された (第 2 図)。

マウス NIH3T3-3 細胞の核成分と細胞質成分を同様に電気泳動後、RB1CC-642 抗体を用いてウエスタンブロット解析した。同時に抗スタスミンウサギ抗体を用いてスタスミンの検出も行った。その結果、Rb1cc1 蛋白質は核に局在し、スタスミンは細胞質に存在していることが示された。さらに同細胞を各抗体による免疫細胞染色を行い比較したところ、RB1CC-642 抗体では核が染色され、一方抗スタスミンウサギ抗体では細胞質が染色された（第 3 図）。

以上の結果、本発明の新規蛋白質 RB1CC1 は哺乳動物細胞の核に存在することが示された。

10

（実施例 5 本発明の RB1CC1 遺伝子の発現に対する抗癌剤の効果）
親細胞（U-2 OS）、MDR に変異した細胞（U-2 OS/DX580）と MDR1 遺伝子を導入した U-2 OS 細胞（U-2/DOXO35）に対してドキソルビシン（doxorubicin）処理をした 4 種の細胞について、抗癌剤の影響を調べた。抗癌剤ドキソルビシン（doxorubicin）、450ng/mL の存在下での細胞増殖の影響を調べた。その結果、第 4 図に示すように親細胞 U-2 OS 細胞と遺伝子導入コントロール細胞（U-2/Neo8）では抗癌剤によって細胞増殖が抑えられるのに対して、MDR に変異した細胞（U-2 OS/DX580）と MDR1 遺伝子を導入した U-2 OS 細胞（U-2/DOXO35）の場合には抗癌剤の効果はなく細胞増殖が 120 時間以上続いた（第 4 図）。

上記の実験で得られた各経時的に得られた細胞の mRNA 発現レベルの解析を行った。本発明の新規遺伝子 RB1CC1 遺伝子、RB1 遺伝子及び MDR1 遺伝子を、RB1 遺伝子の発現レベルをヒト RB1 mRNA のヌクレオチド配列 336～675 の部位にハイブリダイズするプローブを用いて検出した以外は実施例 3 と同様にそれぞれ解析した。その結果を第 5 図に示した。抗癌剤の効果が認められた親細胞 U-2 OS 細胞と遺伝子導入

コントロール細胞 (U-2/Neo8) では、経時的に RB1CC1 遺伝子の発現が低下していた。対照的に、MDR に変異した細胞 (U-2 OS/DX580) と MDR1 遺伝子を導入した U-2 OS 細胞 (U-2/DOXO35) 細胞においてはドキシソルビシン (doxorubicin) 処理によって RB1CC1 遺伝子の発現レ
5 ベルは抑制されず、RB1CC1 遺伝子の発現が増加した。これらの細胞では RB1CC1 遺伝子の発現と RB1 遺伝子の発現が相関していた (第 5 図)。

(実施例 6 本発明の RB1CC1 遺伝子と RB1 遺伝子の発現)

種々の癌細胞における RB1CC1 遺伝子と RB1 遺伝子の発現を半定量
10 RT-PCR 法によって調べた。用いた細胞株は、SARG、IOR/OS9、10、14、15、18、MOS、(これらは進行したヒト骨肉種の手術試料から得た)、Saos-2、HOS、MCF-7、T-47D、BT-20、SK-BR3、ZR75-1、MDA-MB-231、Daudi、Jurkat、K562 (これらはアメリカン タイプ カルチャー コ
レクションより購入)、NZK-K1 (これは 46 才女性の乳癌組織より樹立
15 した)、LK2、QG56、EBC1 及び SBC2 (これらは愛知ガンセンターの成田達彦博士より分与された) である。各細胞株より 2 µg の RNA を抽出し、RT-PCR を 22-30 サイクルかけて増幅した。RB1 遺伝子用のプライマーは公知のプライマーを合成して用いた (Sauerbrey ら、1996 年)。RB1CC1 増幅用プライマー対は配列表・配列番号 19 及び 20 (CC1-S
20 と CC1-AS) の組み合わせを用いた。コントロールとして β2 ミクログロブリンを用いた。これら全ての細胞で RB1CC1 遺伝子の発現は RB1 遺伝子の発現と強く相関した。正常リンパ球 1 例と 6 例の癌細胞 T-47D、MCF7、NZK-K1、Daudi、K562、Jurkat の結果を第 6 図に示した (第 6 図)。

(実施例 7 臓器での本発明の RB1CC1 遺伝子と RB1 遺伝子の発現)

ヒトの脳、心臓、骨格筋、大腸、胸腺、脾臓、腎臓、肝臓、小腸、胎盤、肺、リンパ球の各非腫瘍組織中に発現している RB1CC1 遺伝子と RB1 遺伝子を市販の MTN Blots (Clontech 社製) を用いてノーザンブロット解析によって行った。その結果を第 7 図に示した。心臓及び骨格筋では両遺伝子は強く発現しており、大腸、小腸、肺及びリンパ球では発現は弱かった。しかし、RB1CC1 遺伝子と RB1 遺伝子の発現は相関していた。一方マウスの心臓、脳、脾臓、肺、肝臓、筋肉、腎臓、睾丸の各組織中に発現している Rb1cc1 遺伝子をノーザンブロット解析した。その結果を第 8 図に示した。心臓では 6.2-kb と 6.8-kb の転写産物が強く発現しており、腎臓、肝臓及び筋肉で若干の発現が認められた。睾丸では 6.2-kb の発現が主であり、肺及び脾臓では発現は弱かった(第 7 図、第 8 図)。

(実施例 8 本発明の RB1CC1 遺伝子導入による RB1 遺伝子の発現)

実施例 6 で示した細胞の中で RB1CC1 遺伝子及び RB1 遺伝子の両方が弱い発現レベルであった Jurkat 及び K562 細胞に RB1CC1 遺伝子を外から導入して、RB1 遺伝子の発現レベルの変化を調べた。RB1CC1 分子の完全なコード領域を含む 4.9-kb を pCR3.1-Uni ベクター (Invitrogen 社製) に組み込み、クローニングして RB1CC1 発現ベクター (pCR-RB1CC) を調製した。調製した発現ベクターを K562 及び Jurkat 細胞に組み込み RB1CC1 形質転換細胞を調製した。対照として pCR3.1-Uni ベクターに lac Z 遺伝子を組み込んだものを調製した。親細胞と形質転換細胞 (RB1CC1 遺伝子導入細胞) のそれぞれの RB1CC1 遺伝子と RB1 遺伝子の発現レベルを実施例 6 と同様に操作して調べた。その結果を第 9 図に示した。未転換の細胞及び lac Z 遺伝子を組み込んだ細胞では RB1CC1 遺伝子及び RB1 遺伝子ともに発現は弱い、

RB1CC1 遺伝子を組み込んだ細胞では RB1CC1 遺伝子はもとより RB1 遺伝子も強く発現されていることが判り、RB1CC1 遺伝子の導入（外来性発現）により RB1 遺伝子の発現も誘導されることが示された（第 9 図）。

5 （実施例 9 本発明の RB1CC1 遺伝子の RB1 遺伝子プロモーター転写活性）

RB1CC1 遺伝子の導入が RB1 遺伝子のプロモーター領域の転写活性を増強制御していることを調べた。約 2-kb の RB1 プロモーター領域の遺伝子をプライマー対、5'-GAA GAT CTT TGA AAT TCC TCC TGC
10 ACC A-3' (Bgl.RbPro-S) と 5'-CCC AAG CTT AGC CAG CGA GCT GTG GAG-3' (Hind.RbPro-AS) で増幅させ、PicaGene Basic ベクター 2（東洋インク製）に組み込んだ。そして、RB1 プロモーターが蛍ルシフェラーゼの発現を支配している pGV-RbPro ベクターを調製した。調製した pGV-RbPro ベクターはさらに、内部コントロールとしてシーパ
15 ンジェルルシフェラーゼ遺伝子をコードする pRL-SV40 で重転換させて、K562 細胞に LIPOFECTAMINE PLUS 試薬（GIBCO 社製）を用いて組み込んだ。48 時間後に東洋インク社製の 2 重ルシフェラーゼ分析システムを用いて分析したところ、RB1CC1 遺伝子を導入した K562 細胞ではコントロールの lac Z を組み込んだ K562 細胞に比べて強いルシフェラ
20 ーゼ活性を示し、RB1CC1 遺伝子の導入が RB1 遺伝子プロモーターの転写活性を強めることが判った（第 10 図）。

（実施例 10 原発性乳癌における RB1CC1 遺伝子のローカス (D8S567) でのヘテロ接合性の消失）

25 癌組織の DNA 試料及び同一患者のゲノム DNA を PCR により増幅した試料を尿素変性 8 % ポリアクリルアミドゲル電気泳動により解析した。

電気泳動後、銀染色により得られた結果を第 11 図に示した。何れの患者でもゲノム DNA では 2 本のバンドが認められ、ヘテロ接合性が保持されているのに対して、5 例の癌組織の DNA で 1 本のバンドしか検出されず、ヘテロ接合性の消失を認めた (第 11 図)。

5

(実施例 11 乳癌における本発明の RB1CC1 遺伝子の変異解析)

実施例 1 で用いた配列番号 6 及び 25 のプライマー対 (CC1-S2 と CC1-AS2) により ELONGASE システム (GIBCO 社製) を用いて増幅した cDNA 試料を、ABI PRISM310 型遺伝子解析装置、及び配列表・
10 配列番号 7 ~ 24 のプライマーを用いて、遺伝子配列を解析することにより RB1CC1 遺伝子の変異を同定した。その結果 35 例の乳癌中 7 例の変異例を確認し、9 種類の変異型を確認した。更にこれを配列番号 38 ~ 52 のプライマーを使って再確認した。その結果を表 2 に示した。

(表 2)

15

20

25

表 2 原発性乳癌における RB1CC1 遺伝子の変異

試料名	ヌクレオチド変異	存在部位 (エキソン)	予測される 影響	ゲノム DNA	RB1CC1 遺伝子の状態		RB1 の状態	
					対立遺伝子	蛋白質	LOH	蛋白質
MMK3	c.11_4800del	3-24	Y4fsX4	天然型	複数ヘテロ結合欠損	(-)	(-)	↓↓
	c.325_1585del	5-11	P109fsX122					
MMK6	c.10_4798del	3-24	Y4fsX48	天然型	複数ヘテロ結合欠損	(-)	(-)	(-)
	c.1233_4633del	9-23	D411fsX431					
MMK1	c.957_4785del	7-24	N319fsX368	天然型	ヘテロ接合性消失	(-)	(-)	↓↓
MMK15	c.1635_4719del	12-24	S545fsX557	天然型	ヘテロ接合性消失	(-)	(-)	(-)
MMK31	c.212_4188del	5-24	171fsX111	天然型	ヘテロ接合性消失	(-)	(-)	(-)
MMK38	c.241_4621del	5-22	C81fsX99	天然型	ヘテロ接合性消失	(-)	(-)	↓↓
MMK40	c.591_4678del	7-23	S197fsX212	天然型	ヘテロ接合性消失	(-)	(-)	↓↓

(-): absent, ↓ ↓ : significantly decreased.
LOH: ヘテロ接合性消失

(実施例 1 2)

- 実施例 1 1 で解析した試料のうち RB1CC1 遺伝子に変異の求められた MMK6 と認められなかった MMK29 について PCR 産物を分析した結果とそれに対応する遺伝子配列解析結果を第 1 2 図に示した。その結果、
- 5 変異のない MMK29 では 4.9-kb の遺伝子が発現されているのに対して変異のある MMK6 では 4.9-kb の発現は認められず断片遺伝子 (1456bp と 98bp) の発現が認められた (第 1 2 図)。

(実施例 1 3 ウェスタンブロットによる解析)

- 10 実施例 1 1 で解析した試料のうち RB1CC1 遺伝子に変異を認めた 3 種の癌 (MMK6、MMK40、MMK38) 及び変異を認めなかった 2 例 (MMK12、MMK29) について、新規蛋白質 RB1CC1 と RB1 蛋白質の発現をウェスタンブロットで確認した。抽出蛋白質を 5%SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動した後、PVDF メンブランに転写し、実施例 4 で調製した
- 15 抗ヒト RB1CC1 抗血清 (α -RB1CC-642) を反応させた。RB1 蛋白質は抗 RB1 モノクローナル抗体 (G3-245;PharMingen 社製) を反応させた。反応後、検出は ECL 試薬 (Amersham 社製) で行った。その結果を第 1 3 図に示した。変異のない MMK12 と MMK29 においては 180kDa の分子量を持つ新規蛋白質 RB1CC1 と 110~116kDa の RB1 蛋白質の両
- 20 蛋白質が発現しているのに対して、変異のある 3 例では何れも両蛋白質の発現は認められなかった (第 1 3 図)。

(実施例 1 4 免疫組織染色)

- 実施例 1 1 で解析した試料のうち RB1CC1 遺伝子に変異を認めた 2
- 25 種の癌 (MMK3、MMK6) 及び変異を認めなかった 1 例 (MMK12) の免疫組織染色を行った。反応させる抗体は実施例 1 3 と同じ抗体を用い、

それぞれの癌試料から得たパラフィン固定ブロックより調製した組織切片に抗体を反応させた。第 1 4 図に示したように新規蛋白質 RB1CC1 と RB1 蛋白質の発現レベルは相関しており、RB1CC1 遺伝子に変異を認めた 2 種の癌 (MMK3、MMK6) では変異を認めなかった 1 例 (MMK12) よりも明らかにその発現レベルは低下していることが確認された (第 1 4 図)。

(実施例 1 5)

実施例 1 4 と同様に操作し、54 例の原発性乳癌組織を免疫組織染色により検査したところ、15%にあたる 8 例で RB1CC1 蛋白質が検出されなかった。そして、これら全てで RB1 蛋白質の発現が欠如しているか或いは有意に低下していた。

一方、RB1CC1 蛋白質を発現している 46 例では、45 例において RB1 蛋白質が同時に発現していた。この RB1 蛋白質の発現を免疫組織染色の染色指標 (1000 個以上の細胞のうち染色される細胞の数の割合を%で表したもの) で RB1CC1 陽性群と陰性群で比較すると、RB1CC1 陽性群が $78.6 \pm 13.9\%$ に対して陰性群は $13.6 \pm 12.1\%$ と RB1CC1 の発現と正の相関を示していた (第 1 5 a 図)。一方、Ki-67 の免疫組織染色をマウスモノクローナル抗体 (NCL-Ki-67-MMI、ノボカストラ社製) を用いて行ったところ、その染色指標は RB1CC1 陽性群で $20.3 \pm 12.8\%$ に対して、陰性群では $65.0 \pm 12.2\%$ と明らかに RB1CC1 の発現と逆相関が認められた (第 1 5 b 図)。

これらのことから、RB1CC1 蛋白質の発現が抑制されている癌では、細胞増殖のマーカーである Ki-67 が多量に発現されており、癌細胞の増殖が盛んであることを示している。このように RB1CC1 蛋白質と Ki-67 の両者を組み合わせて検査することにより、癌の診断に有用であること

が判った。

産業上の利用の可能性

- 本発明の新規遺伝子（RB1CC1 遺伝子）及びその蛋白質（RB1CC1）
- 5 を検査することにより、癌細胞の増殖及び癌の診断に有用な情報を提供
できる。

10

15

20

25

請 求 の 範 囲

1. ヒト又は動物の細胞の核に存在し、転写因子機能及び／又はレチ
ノブラストーマ遺伝子（RB1 遺伝子）或いはその遺伝子産物の発現を誘
5 導しうる機能を有する蛋白質又はポリペプチド。

2. 請求の範囲第 1 項記載のヒト蛋白質が下記の群より選ばれるポリ
ペプチド又は蛋白質；（1）配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列で
示されるポリペプチド又は蛋白質、（2）前記のポリペプチド又は蛋白質
10 のアミノ酸配列の少なくとも 5 個のアミノ酸配列を含有するポリペプチ
ド、（3）前記のポリペプチド又は蛋白質と少なくとも約 70% のアミノ
酸配列上の相同性を有するポリペプチド又は蛋白質、（4）及び前記（1）
から（3）のポリペプチド又は蛋白質のアミノ酸配列において 1 ないし
数個のアミノ酸の欠失、置換又は付加などの変異あるいは誘発変異を有
15 するポリペプチド又は蛋白質。

3. 請求の範囲第 1 項記載の動物蛋白質がマウス由来の蛋白質であり、
下記の群より選ばれるポリペプチド又は蛋白質；（1）配列表の配列番号
2 に記載のアミノ酸配列で示されるポリペプチド又は蛋白質、（2）前記
20 のポリペプチド又は蛋白質のアミノ酸配列の少なくとも 5 個のアミノ酸
配列を含有するポリペプチド、（3）前記のポリペプチド又は蛋白質と少
なくとも約 70% のアミノ酸配列上の相同性を有するポリペプチド又は
蛋白質、（4）及び前記（1）から（3）のポリペプチド又は蛋白質のア
ミノ酸配列において 1 ないし数個のアミノ酸の欠失、置換又は付加など
25 の変異あるいは誘発変異を有するポリペプチド又は蛋白質。

4. 請求の範囲第1項～第3項に記載のポリペプチド又は蛋白質をコードする核酸又はその相補鎖。
5. 請求の範囲第3項に記載の核酸又はその相補鎖とストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションする核酸。
6. 配列表の配列番号3～4に記載の核酸又はその相補鎖の塩基配列のうち少なくとも15個の連続した塩基配列で示される核酸であって、該核酸の転写によって発現されるポリペプチドが請求の範囲第1項～第3項記載のポリペプチドである核酸。
7. 請求の範囲第4項～第6項のいずれか1項に記載の核酸を含有する組換えベクター。
8. 請求の範囲第7項の組換えベクターで形質転換された形質転換体。
9. 請求の範囲第8項の形質転換体を培養する工程を含む、請求の範囲第1項～第3項に記載のポリペプチド又は蛋白質の製造方法。
10. 10. 請求の範囲第4項～第6項に記載の核酸又はその相補鎖とストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションする配列表の配列番号5～132に記載の核酸プライマー。
11. 請求の範囲第1項～第3項に記載のポリペプチド又は蛋白質を免疫学的に認識する抗体。

- 1 2. 請求の範囲第 1 項～第 3 項に記載のポリペプチド又は蛋白質の転写因子活性及び／又は RB1 遺伝子の発現を誘導しうる機能を阻害もしくは増強する化合物のスクリーニング方法であって、請求の範囲第 1 項～第 3 項に記載のポリペプチド又は蛋白質、請求の範囲第 1 1 項に記載の抗体のうち、少なくともいずれか 1 つを用いることを特徴とするスクリーニング方法。
- 10 1 3. 請求の範囲第 4 項もしくは第 6 項に記載の核酸と相互作用して該核酸の発現を阻害もしくは増強する化合物のスクリーニング方法であって、請求の範囲第 4 項～第 6 項のいずれか 1 項に記載の核酸、請求の範囲第 7 項に記載のベクター、請求の範囲第 8 項に記載の形質転換体、請求の範囲第 1 0 項に記載の核酸プライマーのうち少なくともいずれか 1 つを用いることを特徴とするスクリーニング方法。
- 15 1 4. 請求の範囲第 1 2 項又は第 1 3 項に記載のスクリーニング方法でスクリーニングされる化合物。
- 20 1 5. 請求の範囲第 1 項～第 3 項に記載のポリペプチド又は蛋白質の転写因子活性及び／又は RB1 遺伝子の発現を誘導しうる機能を阻害もしくは増強する化合物。
- 1 6. 請求の範囲第 4 項～第 6 項のいずれか 1 項に記載の核酸と相互作用して該核酸の発現を阻害もしくは増強する化合物。
- 25 1 7. 請求の範囲第 1 項～第 3 項に記載のポリペプチド又は蛋白質、請求の範囲第 4 項～第 6 項のいずれか 1 項に記載の核酸、請求の範囲第

- 7 項に記載のベクター、請求の範囲第 8 項に記載の形質転換体、請求の範囲第 10 項に記載の核酸プライマー、請求の範囲第 11 項に記載の抗体、又は請求の範囲第 14 項～第 16 項のいずれか 1 項に記載の化合物のうち、少なくともいずれか 1 つを含有することを特徴とする、抗がん
- 5 剤の治療に抵抗性である多剤耐性の治療に用いる医薬組成物。

18. 請求の範囲第 1 項～第 3 項に記載のポリペプチド又は蛋白質の発現又は活性に関連した疾病の検査診断方法であって、試料中の (a) 該ポリペプチド又は蛋白質をコードしている核酸、及び／又は (b) 該
- 10 ポリペプチド又は蛋白質をマーカーとして分析することを含む検査診断方法。

19. 癌細胞の検査方法又は癌の診断方法である請求の範囲第 18 項の検査診断方法。

15

20. 請求の範囲第 11 項に記載の抗体を用いることを特徴とする、請求の範囲第 1 項～第 3 項に記載のポリペプチド又は蛋白質の全部又は一部の発現、増加、減少、欠損等を検査する請求の範囲第 18 項又は第 19 項に記載の方法。

20

21. 請求の範囲第 10 項に記載の核酸プライマーの少なくとも何れかの 1 つを用いて請求の範囲第 1 項～第 3 項に記載のポリペプチド又は蛋白質をコードする遺伝子を増幅させる工程を経て、請求の範囲第 1 項～第 3 項に記載のポリペプチド又は蛋白質をコードする遺伝子の全部又は
- 25 は一部の発現、変異、欠損又は挿入等を検査する請求の範囲第 18 項又は第 19 項に記載の方法。

22. 癌抑制遺伝子レチノブラストーマ遺伝子 (RB1 遺伝子) 或いはその遺伝子産物 (RB1 蛋白質) の全部又は一部の発現、増加、減少、変異、欠損又は挿入等を検査することを組み合わせることを特徴とする請求の範囲第18項～第21項に記載の方法。

5

23. 多剤耐性遺伝子、(MDR1 遺伝子) の或いはその遺伝子産物 (MDR1 蛋白質 : P-糖蛋白質) の全部又は一部の発現、増加、減少、変異、欠損又は挿入等を検査することを組み合わせることを特徴とする請求の範囲第18項～第22項に記載の方法。

10

24. 細胞増殖マーカー、Ki-67 蛋白質、の全部又は一部の発現、増加、減少等を検査することを組み合わせることを特徴とする請求の範囲第18項～第23項に記載の方法。

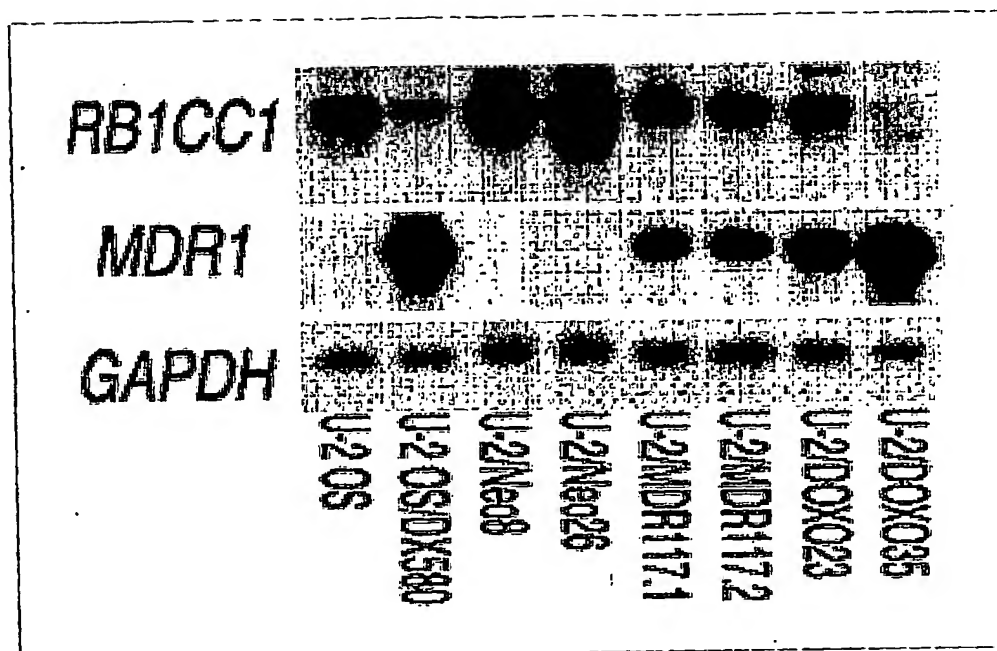
15 25. 請求の範囲第23項記載の方法を用いる癌細胞の薬剤感受性を検査する方法。

26. 請求の範囲第18項～第25項に記載の方法に用いる検査診断試薬及びキット。

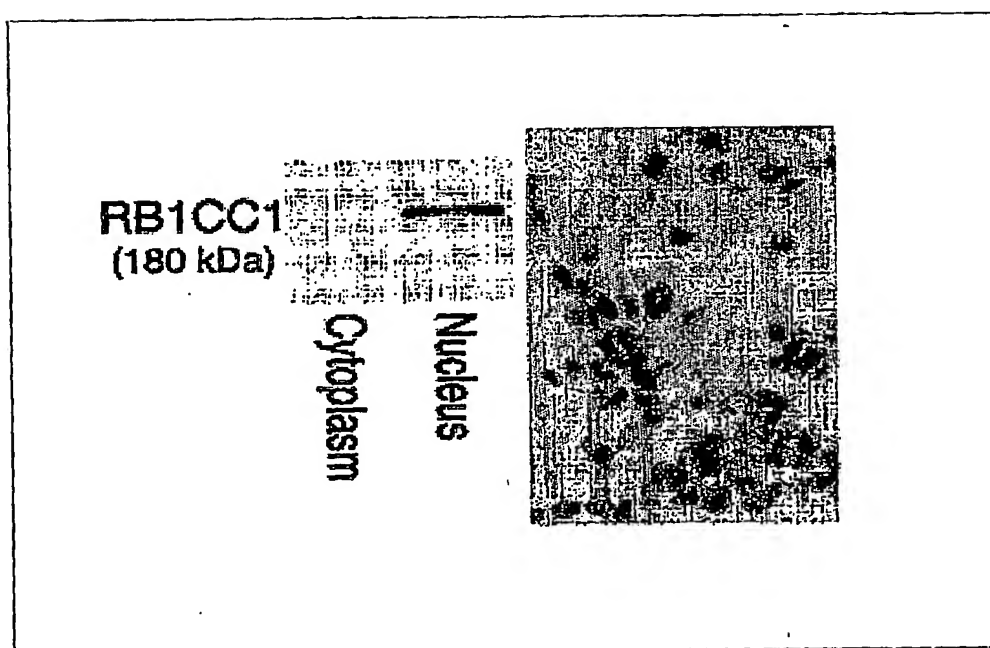
20

25

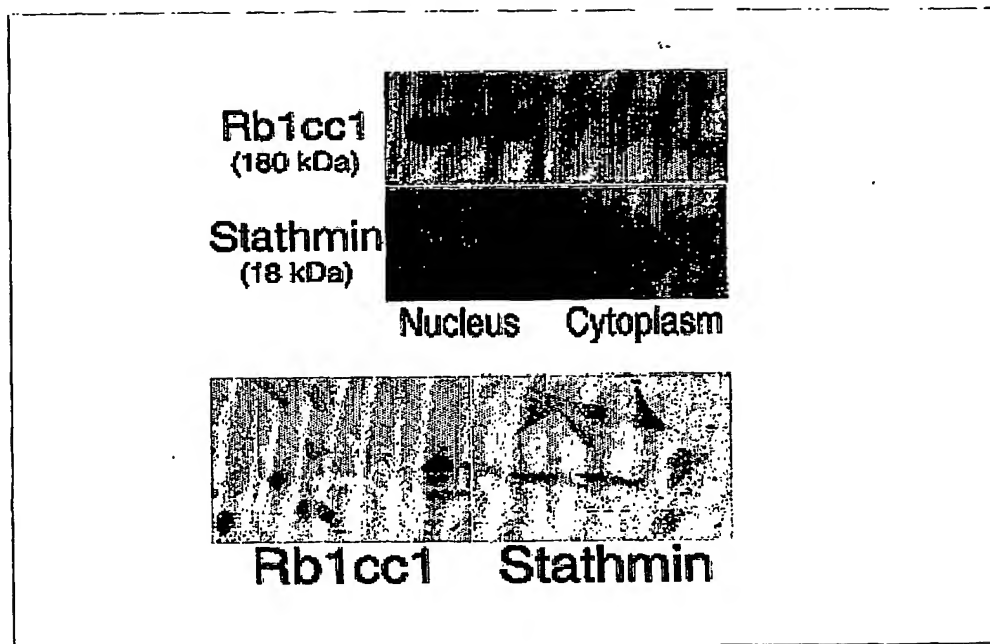
第 1 図



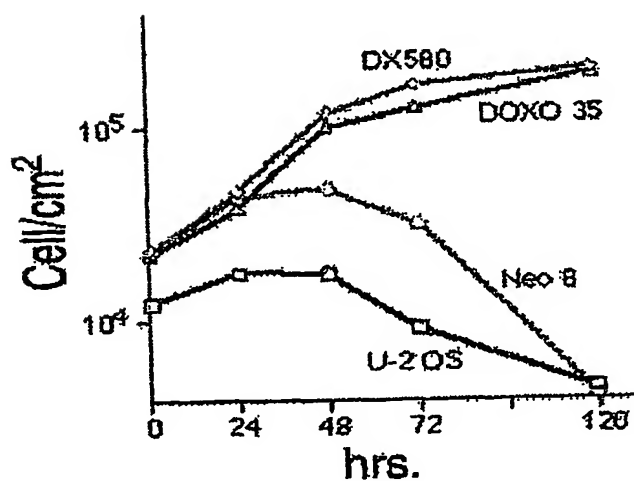
第 2 図



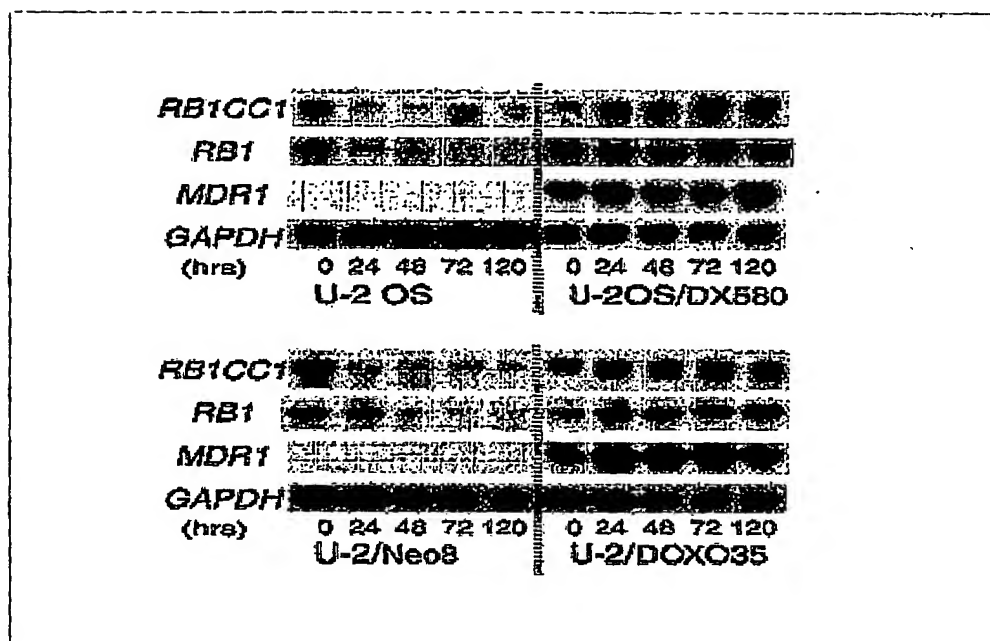
第3図



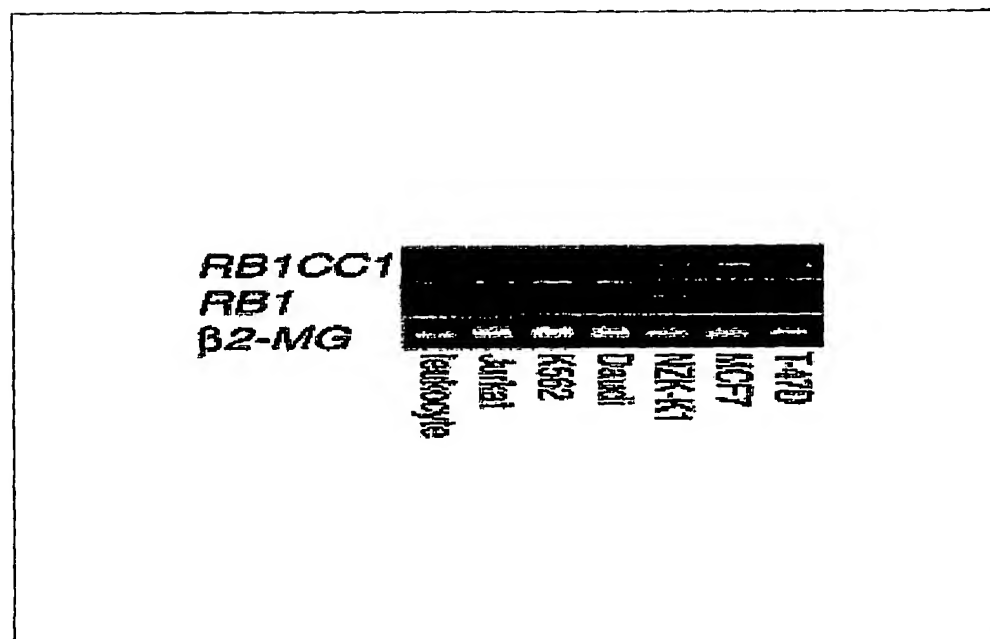
第4図



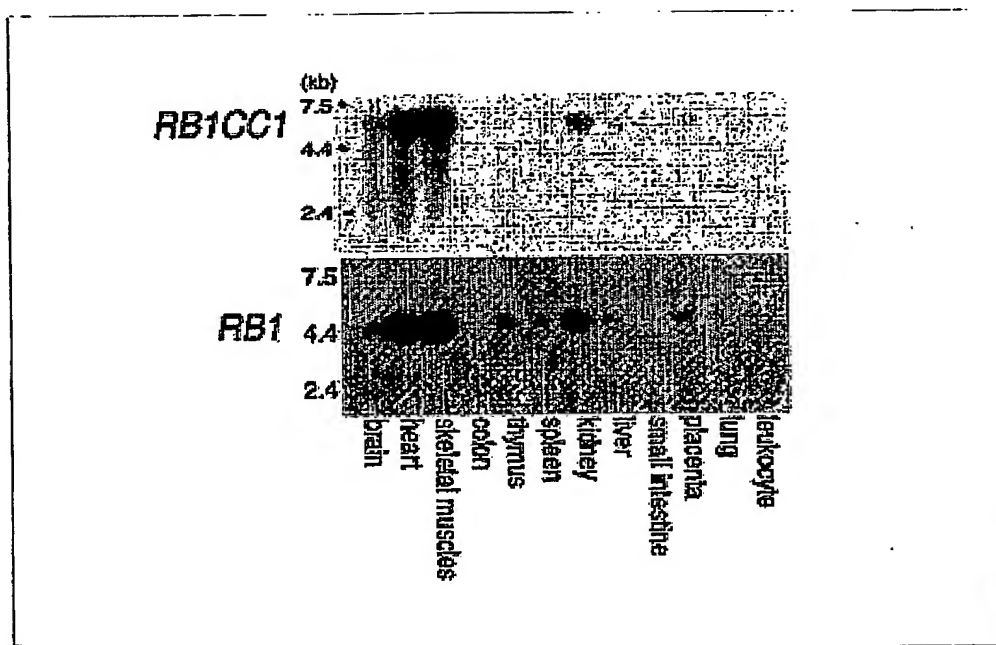
第5図



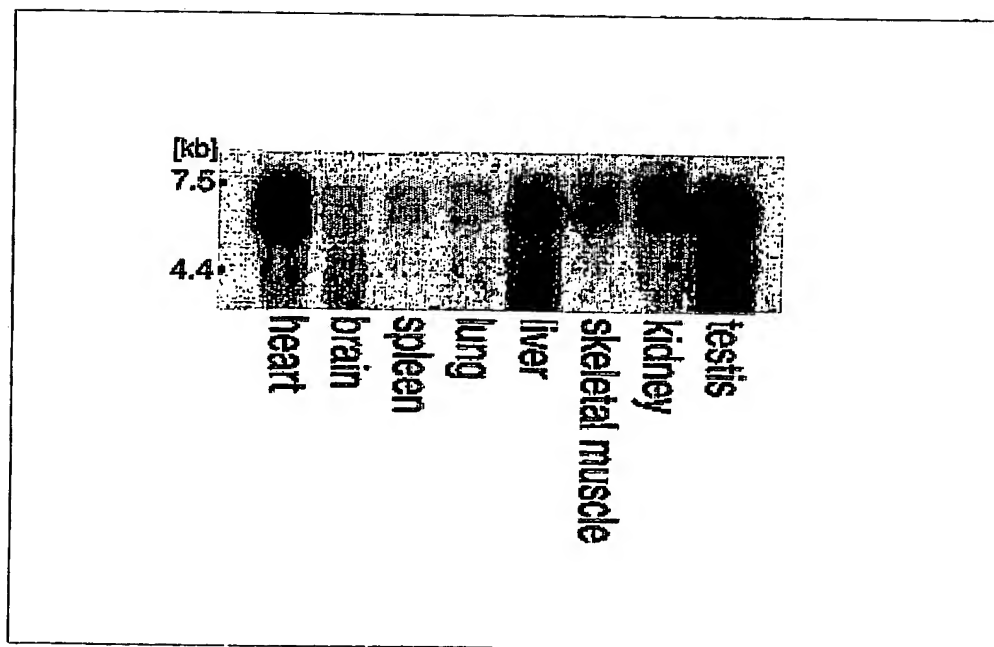
第6図



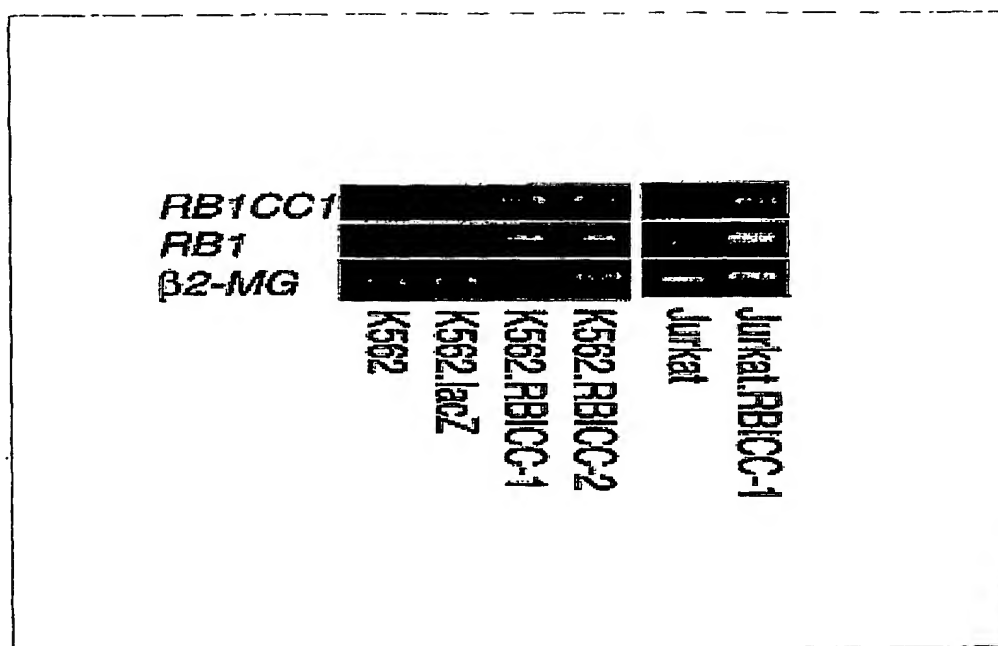
第 7 図



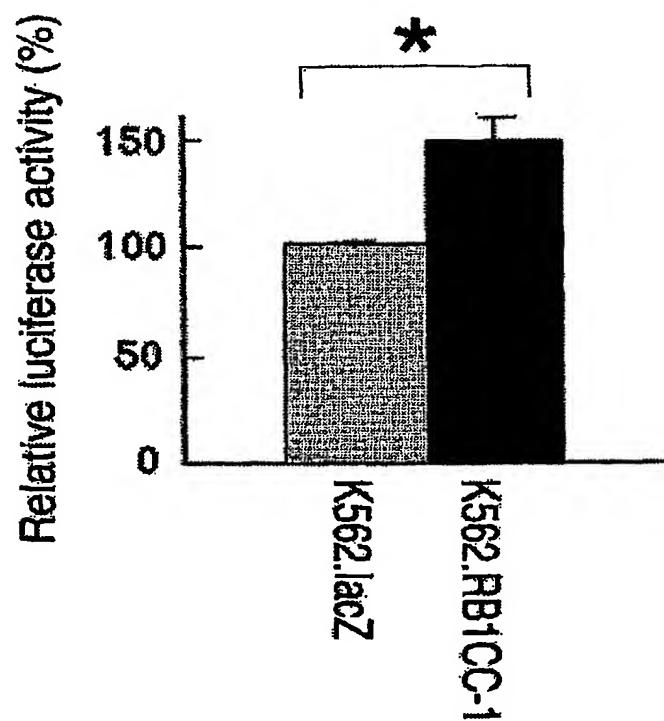
第 8 図



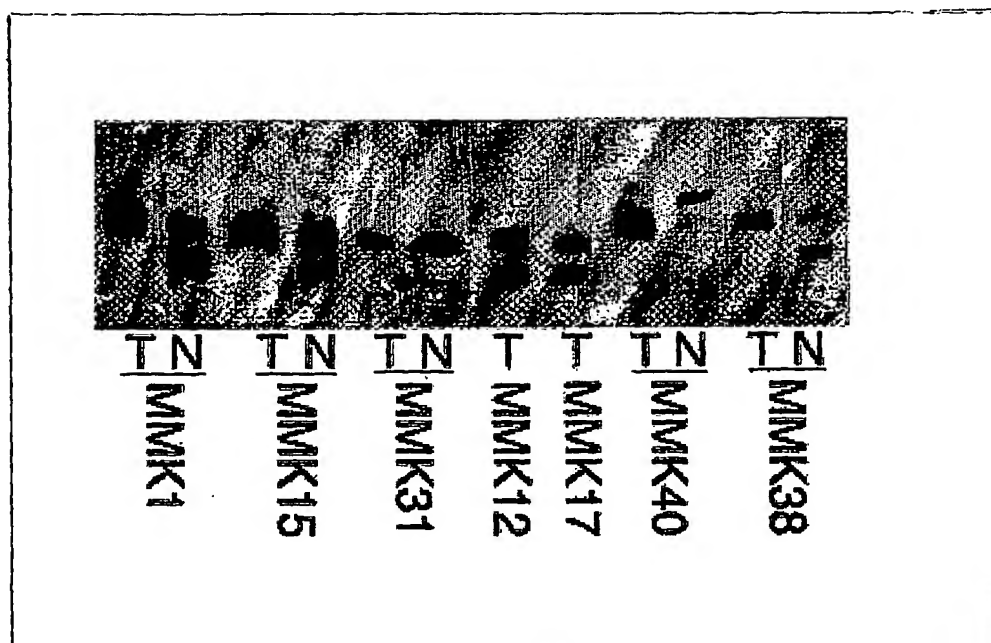
第 9 図



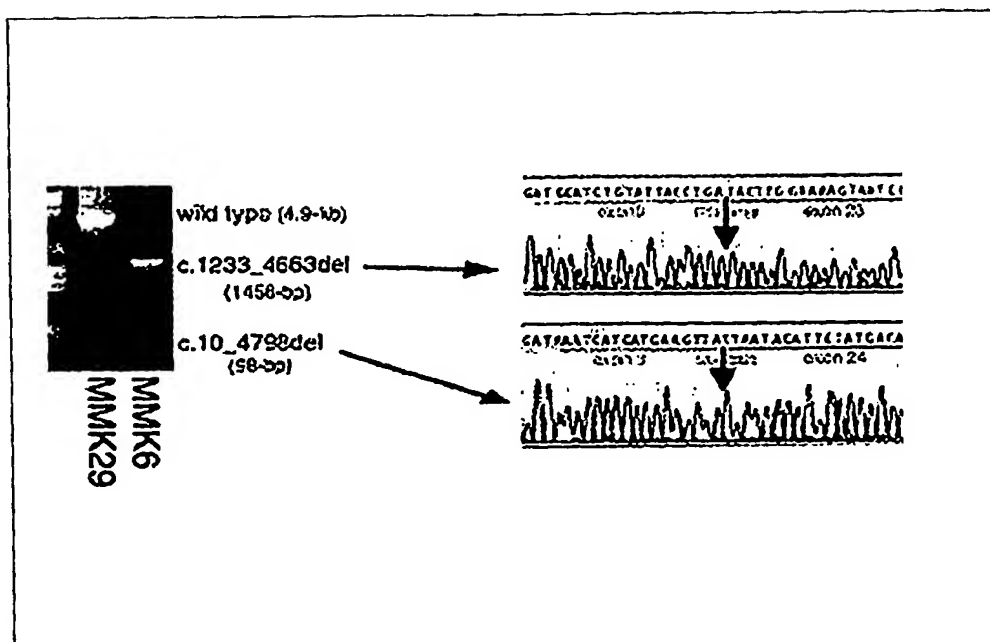
第 10 図



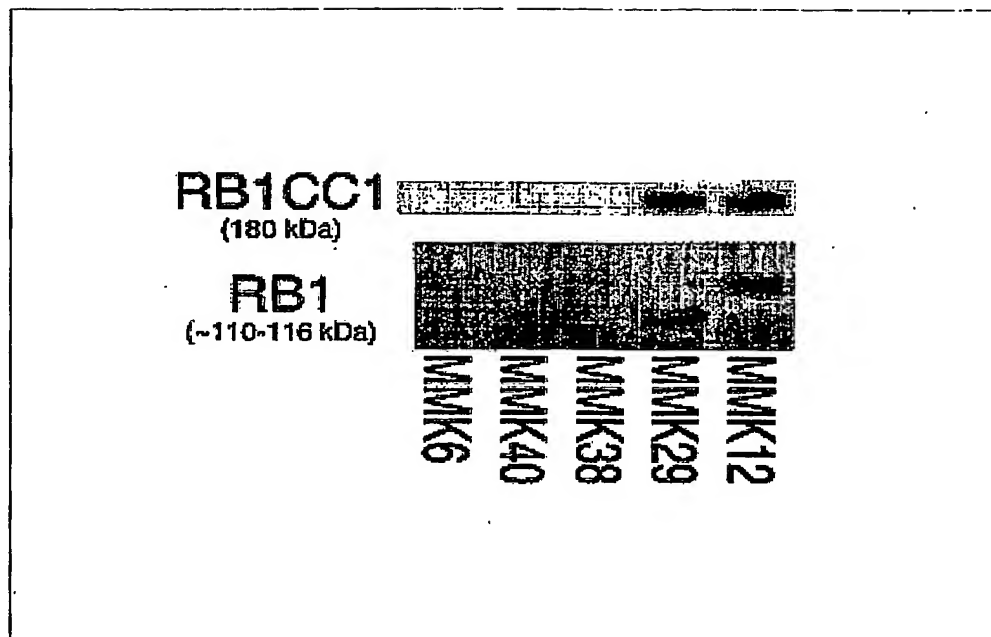
第 1 1 図



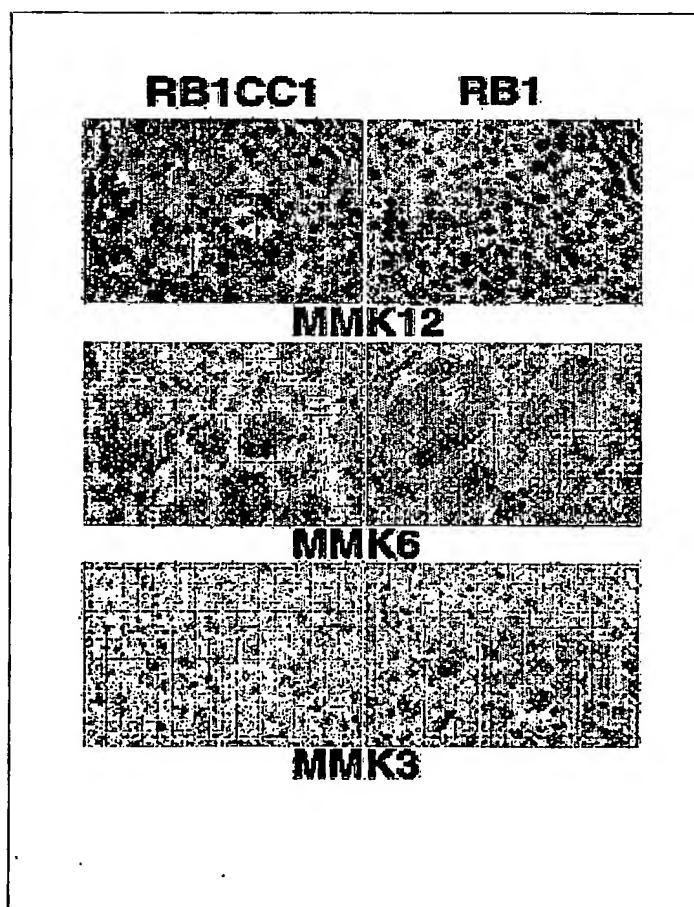
第 1 2 図



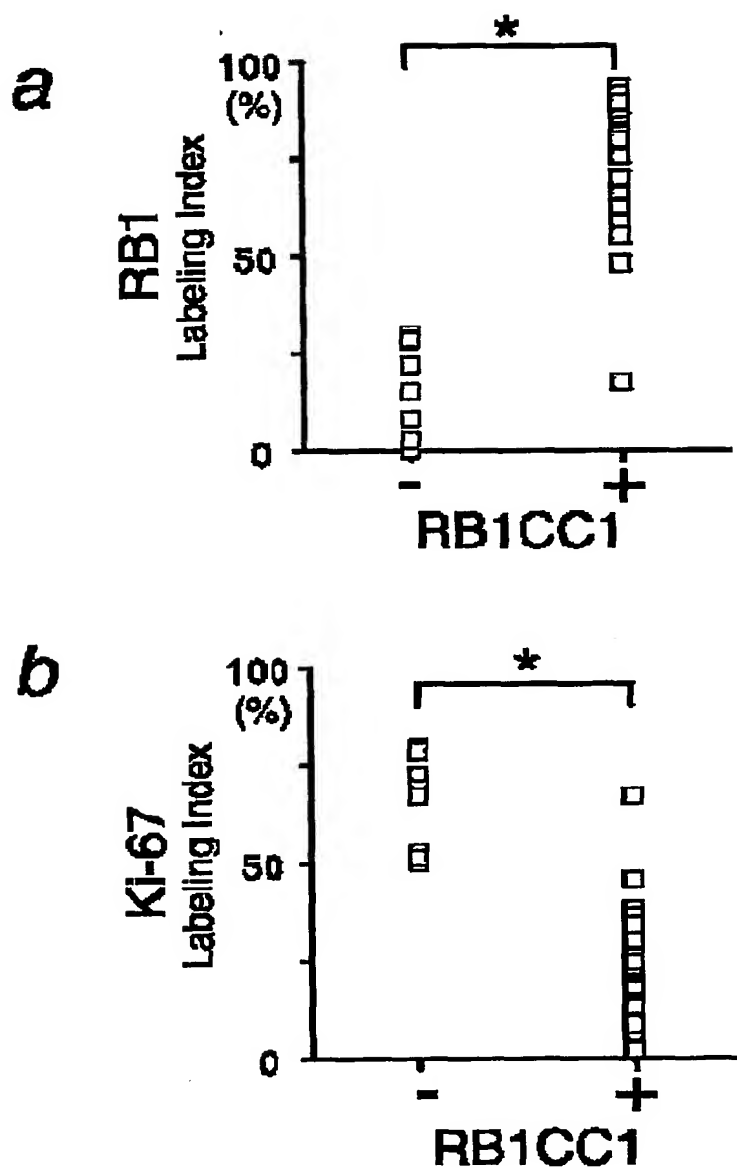
第 1 3 図



第 1 4 図



第 15 図



1 / 61

SEQUENCE LISTING

<110> Chano, Tokuhiko
Okabe, Hidetoshi
Ikegawa, Shiro

<120> RB1 gene induced protein and gene thereof

<130> GP02-1023PCT

<150> JP P2002-161400

<151> 2002-06-03

<150> JP P2002-214978

<151> 2002-07-24

<160> 132

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1594

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> human RB1CC1

<400> 1

Met Lys Leu Tyr Val Phe Leu Val Asn Thr Gly Thr Thr Leu Thr Phe
1 5 10 15

Asp Thr Glu Leu Thr Val Gln Thr Val Ala Asp Leu Lys His Ala Ile
20 25 30

Gln Ser Lys Tyr Lys Ile Ala Ile Gln His Gln Val Leu Val Val Asn
35 40 45

Gly Gly Glu Cys Met Ala Ala Asp Arg Arg Val Cys Thr Tyr Ser Ala
50 55 60

Gly Thr Asp Thr Asn Pro Ile Phe Leu Phe Asn Lys Glu Met Ile Leu

2 / 61

65 70 75 80

Cys Asp Arg Pro Pro Ala Ile Pro Lys Thr Thr Phe Ser Thr Glu Asn
 85 90 95

Asp Met Glu Ile Lys Val Glu Glu Ser Leu Met Met Pro Ala Val Phe
 100 105 110

His Thr Val Ala Ser Arg Thr Gln Leu Ala Leu Glu Met Tyr Glu Val
 115 120 125

Ala Lys Lys Leu Cys Ser Phe Cys Glu Gly Leu Val His Asp Glu His
 130 135 140

Leu Gln His Gln Gly Trp Ala Ala Ile Met Ala Asn Leu Glu Asp Cys
145 150 155 160

Ser Asn Ser Tyr Gln Lys Leu Leu Phe Lys Phe Glu Ser Ile Tyr Ser
 165 170 175

Asn Tyr Leu Gln Ser Ile Glu Asp Ile Lys Leu Lys Leu Thr His Leu
 180 185 190

Gly Thr Ala Val Ser Val Met Ala Lys Ile Pro Leu Leu Glu Cys Leu
 195 200 205

Thr Arg His Ser Tyr Arg Glu Cys Leu Gly Arg Leu Asp Ser Leu Pro
210 215 220

Glu His Glu Asp Ser Glu Lys Ala Glu Thr Lys Arg Ser Thr Glu Leu
225 230 235 240

Val Leu Ser Pro Asp Met Pro Arg Thr Thr Asn Glu Ser Leu Leu Thr
 245 250 255

3 / 61

Ser Phe Pro Lys Ser Val Glu His Val Ser Pro Asp Thr Ala Asp Ala
260 265 270

Glu Ser Gly Lys Glu Ile Arg Glu Ser Cys Gln Ser Thr Val His Gln
275 280 285

Gln Asp Glu Thr Thr Ile Asp Thr Lys Asp Gly Asp Leu Pro Phe Phe
290 295 300

Asn Val Ser Leu Leu Asp Trp Ile Asn Val Gln Asp Arg Pro Asn Asp
305 310 315 320

Val Glu Ser Leu Val Arg Lys Cys Phe Asp Ser Met Ser Arg Leu Asp
325 330 335

Pro Arg Ile Ile Arg Pro Phe Ile Ala Glu Cys Arg Gln Thr Ile Ala
340 345 350

Lys Leu Asp Asn Gln Asn Met Lys Ala Ile Lys Gly Leu Glu Asp Arg
355 360 365

Leu Tyr Ala Leu Asp Gln Met Ile Ala Ser Cys Gly Arg Leu Val Asn
370 375 380

Glu Gln Lys Glu Leu Ala Gln Gly Phe Leu Ala Asn Gln Lys Arg Ala
385 390 395 400

Glu Asn Leu Lys Asp Ala Ser Val Leu Pro Asp Leu Cys Leu Ser His
405 410 415

Ala Asn Gln Leu Met Ile Met Leu Gln Asn His Arg Lys Leu Leu Asp
420 425 430

Ile Lys Gln Lys Cys Thr Thr Ala Lys Gln Glu Leu Ala Asn Asn Leu
435 440 445

4 / 61

His Val Arg Leu Lys Trp Cys Cys Phe Val Met Leu His Ala Asp Gln
450 455 460

Asp Gly Glu Lys Leu Gln Ala Leu Leu Arg Leu Val Ile Glu Leu Leu
465 470 475 480

Glu Arg Val Lys Ile Val Glu Ala Leu Ser Thr Val Pro Gln Met Tyr
485 490 495

Cys Leu Ala Val Val Glu Val Val Arg Arg Lys Met Phe Ile Lys His
500 505 510

Tyr Arg Glu Trp Ala Gly Ala Leu Val Lys Asp Gly Lys Arg Leu Tyr
515 520 525

Glu Ala Glu Lys Ser Lys Arg Glu Ser Phe Gly Lys Leu Phe Arg Lys
530 535 540

Ser Phe Leu Arg Asn Arg Leu Phe Arg Gly Leu Asp Ser Trp Pro Pro
545 550 555 560

Ser Phe Cys Thr Gln Lys Pro Arg Lys Phe Asp Cys Glu Leu Pro Asp
565 570 575

Ile Ser Leu Lys Asp Leu Gln Phe Leu Gln Ser Phe Cys Pro Ser Glu
580 585 590

Val Gln Pro Phe Leu Arg Val Pro Leu Leu Cys Asp Phe Glu Pro Leu
595 600 605

His Gln His Val Leu Ala Leu His Asn Leu Val Lys Ala Ala Gln Ser
610 615 620

Leu Asp Glu Met Ser Gln Thr Ile Thr Asp Leu Leu Ser Glu Gln Lys
625 630 635 640

5 / 61

Ala Ser Val Ser Gln Thr Ser Pro Gln Ser Ala Ser Ser Pro Arg Met
645 650 655

Glu Ser Thr Ala Gly Ile Thr Thr Thr Thr Ser Pro Arg Thr Pro Pro
660 665 670

Pro Leu Thr Val Gln Asp Pro Leu Cys Pro Ala Val Cys Pro Leu Glu
675 680 685

Glu Leu Ser Pro Asp Ser Ile Asp Ala His Thr Phe Asp Phe Glu Thr
690 695 700

Ile Pro His Pro Asn Ile Glu Gln Thr Ile His Gln Val Ser Leu Asp
705 710 715 720

Leu Asp Ser Leu Ala Glu Ser Pro Glu Ser Asp Phe Met Ser Ala Val
725 730 735

Asn Glu Phe Val Ile Glu Glu Asn Leu Ser Ser Pro Asn Pro Ile Ser
740 745 750

Asp Pro Gln Ser Pro Glu Met Met Val Glu Ser Leu Tyr Ser Ser Val
755 760 765

Ile Asn Ala Ile Asp Ser Arg Arg Met Gln Asp Thr Asn Val Cys Gly
770 775 780

Lys Glu Asp Phe Gly Asp His Thr Ser Leu Asn Val Gln Leu Glu Arg
785 790 795 800

Cys Arg Val Val Ala Gln Asp Ser His Phe Ser Ile Gln Thr Ile Lys
805 810 815

Glu Asp Leu Cys His Phe Arg Thr Phe Val Gln Lys Glu Gln Cys Asp

6 / 61

820

825

830

Phe Ser Asn Ser Leu Lys Cys Thr Ala Val Glu Ile Arg Asn Ile Ile
835 840 845

Glu Lys Val Lys Cys Ser Leu Glu Ile Thr Leu Lys Glu Lys His Gln
850 855 860

Lys Glu Leu Leu Ser Leu Lys Asn Glu Tyr Glu Gly Lys Leu Asp Gly
865 870 875 880

Leu Ile Lys Glu Thr Glu Glu Asn Glu Asn Lys Ile Lys Lys Leu Lys
885 890 895

Gly Glu Leu Val Cys Leu Glu Glu Val Leu Gln Asn Lys Asp Asn Glu
900 905 910

Phe Ala Leu Val Lys His Glu Lys Glu Ala Val Ile Cys Leu Gln Asn
915 920 925

Glu Lys Asp Gln Lys Leu Leu Glu Met Glu Asn Ile Met His Ser Gln
930 935 940

Asn Cys Glu Ile Lys Glu Leu Lys Gln Ser Arg Glu Ile Val Leu Glu
945 950 955 960

Asp Leu Lys Lys Leu His Val Glu Asn Asp Glu Lys Leu Gln Leu Leu
965 970 975

Arg Ala Glu Leu Gln Ser Leu Glu Gln Ser His Leu Lys Glu Leu Glu
980 985 990

Asp Thr Leu Gln Val Arg His Ile Gln Glu Phe Glu Lys Val Met Thr
995 1000 1005

7 / 61

Asp His Arg Val Ser Leu Glu Glu Leu Lys Lys Glu Asn Gln Gln
1010 1015 1020

Ile Ile Asn Gln Ile Gln Glu Ser His Ala Glu Ile Ile Gln Glu
1025 1030 1035

Lys Glu Lys Gln Leu Gln Glu Leu Lys Leu Lys Val Ser Asp Leu
1040 1045 1050

Ser Asp Thr Arg Cys Lys Leu Glu Val Glu Leu Ala Leu Lys Glu
1055 1060 1065

Ala Glu Thr Asp Glu Ile Lys Ile Leu Leu Glu Glu Ser Arg Ala
1070 1075 1080

Gln Gln Lys Glu Thr Leu Lys Ser Leu Leu Glu Gln Glu Thr Glu
1085 1090 1095

Asn Leu Arg Thr Glu Ile Ser Lys Leu Asn Gln Lys Ile Gln Asp
1100 1105 1110

Asn Asn Glu Asn Tyr Gln Val Gly Leu Ala Glu Leu Arg Thr Leu
1115 1120 1125

Met Thr Ile Glu Lys Asp Gln Arg Ile Ser Glu Leu Ile Ser Arg
1130 1135 1140

His Glu Glu Glu Ser Asn Ile Leu Lys Ala Glu Leu Asn Lys Val
1145 1150 1155

Thr Ser Leu His Asn Gln Ala Phe Glu Ile Glu Lys Asn Leu Lys
1160 1165 1170

Glu Gln Ile Ile Glu Leu Gln Ser Lys Leu Asp Ser Glu Leu Ser
1175 1180 1185

8 / 61

Ala Leu Glu Arg Gln Lys Asp Glu Lys Ile Thr Gln Gln Glu Glu
1190 1195 1200

Lys Tyr Glu Ala Ile Ile Gln Asn Leu Glu Lys Asp Arg Gln Lys
1205 1210 1215

Leu Val Ser Ser Gln Glu Gln Asp Arg Glu Gln Leu Ile Gln Lys
1220 1225 1230

Leu Asn Cys Glu Lys Asp Glu Ala Ile Gln Thr Ala Leu Lys Glu
1235 1240 1245

Phe Lys Leu Glu Arg Glu Val Val Glu Lys Glu Leu Leu Glu Lys
1250 1255 1260

Val Lys His Leu Glu Asn Gln Ile Ala Lys Ser Pro Ala Ile Asp
1265 1270 1275

Ser Thr Arg Gly Asp Ser Ser Ser Leu Val Ala Glu Leu Gln Glu
1280 1285 1290

Lys Leu Gln Glu Glu Lys Ala Lys Phe Leu Glu Gln Leu Glu Glu
1295 1300 1305

Gln Glu Lys Arg Lys Asn Glu Glu Met Gln Asn Val Arg Thr Ser
1310 1315 1320

Leu Ile Ala Glu Gln Gln Thr Asn Phe Asn Thr Val Leu Thr Arg
1325 1330 1335

Glu Lys Met Arg Lys Glu Asn Ile Ile Asn Asp Leu Ser Asp Lys
1340 1345 1350

Leu Lys Ser Thr Met Gln Gln Gln Glu Arg Asp Lys Asp Leu Ile
1355 1360 1365

9 / 61

Glu Ser Leu Ser Glu Asp Arg Ala Arg Leu Leu Glu Glu Lys Lys
1370 1375 1380

Lys Leu Glu Glu Glu Val Ser Lys Leu Arg Ser Ser Ser Phe Val
1385 1390 1395

Pro Ser Pro Tyr Val Ala Thr Ala Pro Glu Leu Tyr Gly Ala Cys
1400 1405 1410

Ala Pro Glu Leu Pro Gly Glu Ser Asp Arg Ser Ala Val Glu Thr
1415 1420 1425

Ala Asp Glu Gly Arg Val Asp Ser Ala Met Glu Thr Ser Met Met
1430 1435 1440

Ser Val Gln Glu Asn Ile His Met Leu Ser Glu Glu Lys Gln Arg
1445 1450 1455

Ile Met Leu Leu Glu Arg Thr Leu Gln Leu Lys Glu Glu Glu Asn
1460 1465 1470

Lys Arg Leu Asn Gln Arg Leu Met Ser Gln Ser Met Ser Ser Val
1475 1480 1485

Ser Ser Arg His Ser Glu Lys Ile Ala Ile Arg Asp Phe Gln Val
1490 1495 1500

Gly Asp Leu Val Leu Ile Ile Leu Asp Glu Arg His Asp Asn Tyr
1505 1510 1515

Val Leu Phe Thr Val Ser Pro Thr Leu Tyr Phe Leu His Ser Glu
1520 1525 1530

Ser Leu Pro Ala Leu Asp Leu Lys Pro Gly Glu Gly Ala Ser Gly

10 / 61

1535

1540

1545

Ala Ser Arg Arg Pro Trp Val Leu Gly Lys Val Met Glu Lys Glu
 1550 1555 1560

Tyr Cys Gln Ala Lys Lys Ala Gln Asn Arg Phe Lys Val Pro Leu
 1565 1570 1575

Gly Thr Lys Phe Tyr Arg Val Lys Ala Val Ser Trp Asn Lys Lys
 1580 1585 1590

Val

<210> 2
 <211> 1588
 <212> PRT
 <213> Unknown

<220>
 <223> mouse Rb1cc1

<400> 2

Met Lys Leu Tyr Val Phe Leu Val Asn Thr Gly Thr Thr Leu Thr Phe
 1 5 10 15

Asp Thr Glu Leu Thr Val Gln Thr Val Ala Asp Leu Lys His Ala Ile
 20 25 30

Gln Ser Lys Tyr Lys Ile Ala Ile Gln His Gln Val Leu Val Val Asn
 35 40 45

Gly Gly Glu Cys Met Ala Ala Asp Arg Arg Val Cys Thr Tyr Ser Ala
 50 55 60

Gly Thr Asp Thr Asn Pro Ile Phe Leu Phe Asn Lys Glu Met Ile Leu
 65 70 75 80

11 / 61

Cys Asp Arg Ala Pro Ala Ile Pro Lys Ala Thr Phe Ser Thr Glu Asn
85 90 95

Asp Met Glu Ile Lys Val Glu Glu Ser Leu Met Met Pro Ala Val Phe
100 105 110

His Thr Val Ala Ser Arg Thr Gln Leu Ala Val Glu Met Tyr Asp Val
115 120 125

Ala Lys Lys Leu Cys Ser Phe Cys Glu Gly Leu Val His Asp Glu His
130 135 140

Leu Gln His Gln Gly Trp Ala Ala Ile Met Ala Asn Leu Glu Asp Cys
145 150 155 160

Ser Asn Ser Tyr Gln Lys Leu Leu Phe Lys Phe Glu Ser Ile Tyr Ser
165 170 175

Asp Tyr Leu Gln Ser Ile Glu Asp Ile Lys Leu Lys Leu Thr His Leu
180 185 190

Gly Thr Ala Val Ser Val Met Ala Lys Ile Pro Leu Leu Glu Cys Leu
195 200 205

Thr Arg His Ser Tyr Arg Glu Cys Leu Gly Arg Pro Asp Ser Leu Asn
210 215 220

Glu His Glu Gly Ser Glu Lys Ala Glu Met Lys Arg Ser Thr Glu Leu
225 230 235 240

Val Leu Ser Pro Asp Met Pro Arg Thr Thr Asn Thr Ser Leu Val Thr
245 250 255

Ser Phe His Lys Ser Met Glu His Val Ala Pro Asp Pro Thr Gly Thr

12 / 61

260

265

270

Glu Arg Gly Lys Glu Leu Arg Glu Ser Cys Gln Ser Thr Val Gln Gln
275 280 285

Glu Glu Ala Ser Val Asp Ala Lys Asp Ser Asp Leu Pro Phe Phe Asn
290 295 300

Val Ser Leu Leu Asp Trp Ile Asn Val Gln Asp Arg Pro Asn Asp Val
305 310 315 320

Glu Ser Leu Val Arg Lys Cys Phe Asp Ser Met Ser Arg Leu Asp Pro
325 330 335

Lys Ile Ile Gln Pro Phe Met Leu Glu Cys His Gln Thr Ile Ala Lys
340 345 350

Leu Asp Asn Gln Asn Met Lys Ala Ile Lys Gly Leu Glu Asp Arg Leu
355 360 365

Tyr Ala Leu Asp Gln Met Ile Ala Ser Cys Ser Arg Leu Val Asn Glu
370 375 380

Gln Lys Glu Leu Ala Gln Gly Phe Leu Ala Asn Gln Met Arg Ala Glu
385 390 395 400

Asn Leu Lys Asp Ala Ser Val Leu Pro Asp Leu Cys Leu Ser His Ala
405 410 415

Asn Gln Leu Met Ile Met Leu Gln Asn His Arg Lys Leu Leu Asp Ile
420 425 430

Lys Gln Lys Cys Thr Thr Ala Lys Gln Glu Leu Ala Asn Asn Leu His
435 440 445

13 / 61

Val Arg Leu Lys Trp Cys Cys Phe Val Met Leu His Ala Asp Gln Asp
450 455 460

Gly Glu Lys Leu Gln Ala Leu Leu Arg Leu Val Ile Glu Leu Leu Glu
465 470 475 480

Arg Val Arg Ile Val Glu Ala Leu Ser Thr Val Pro Gln Met Tyr Cys
485 490 495

Leu Ala Val Val Glu Val Val Arg Arg Lys Met Phe Ile Lys His Tyr
500 505 510

Arg Glu Trp Ala Gly Ala Leu Val Lys Asp Gly Lys Gln Leu Tyr Glu
515 520 525

Ala Glu Lys Ser Lys Arg Glu Ser Phe Gly Lys Leu Phe Arg Lys Ser
530 535 540

Phe Leu Arg Asn Arg Leu Phe Lys Gly Leu Asp Ser Trp Pro Ser Ser
545 550 555 560

Phe Cys Thr Gln Lys Pro Arg Lys Phe Asp Cys Glu Leu Pro Asp Ile
565 570 575

Ser Leu Lys Asp Leu Gln Phe Leu Gln Ser Phe Cys Pro Ser Glu Val
580 585 590

Gln Pro Phe Leu Arg Val Pro Leu Leu Cys Asp Phe Glu Pro Leu His
595 600 605

Gln His Val Leu Ala Leu His Asn Leu Val Lys Ala Ala Gln Ser Leu
610 615 620

Asp Glu Met Ser Gln Thr Ile Thr Asp Leu Leu Asn Glu Gln Lys Val
625 630 635 640

14 / 61

Ser Thr Ser Gln Ala Ser Pro Gln Ser Ala Ala Ser Pro Arg Ile Glu
645 650 655

Ser Thr Thr Gly Ile Thr Thr Thr Thr Ser Pro Lys Thr Pro Pro Pro
660 665 670

Leu Thr Val Gln Asp Thr Leu Cys Pro Ala Val Cys Pro Leu Glu Glu
675 680 685

Leu Ser Pro Asp Ser Ile Asp Ala His Thr Phe Asp Phe Glu Thr Ile
690 695 700

Ser His Pro Asn Thr Glu Gln Pro Val His Gln Ala Ser Ile Asp Leu
705 710 715 720

Asp Ser Leu Ala Glu Ser Pro Glu Ser Asp Phe Met Ser Ala Val Asn
725 730 735

Glu Phe Val Ile Glu Glu Asn Leu Ser Ser Pro Asn Pro Ile Ser Asp
740 745 750

Pro Gln Ser Pro Glu Met Met Val Glu Ser Leu Tyr Ser Ser Val Ile
755 760 765

Asn Ala Ile Asp Ser Arg Arg Met Gln Asp Thr Ser Thr Arg Gly Asn
770 775 780

Glu Gly Phe Gly Asp Arg Ala Ala Leu His Val Gln Leu Glu Lys Cys
785 790 795 800

Arg Ala Ala Ala Gln Asp Ser His Thr Ser Ile Gln Thr Ile Lys Asp
805 810 815

Asp Leu Cys His Phe Arg Thr Phe Val Gln Lys Glu Gln Cys Asp Leu
820 825 830

15 / 61

Ala Asn Tyr Leu Lys Cys Thr Ala Val Glu Ile Arg Asn Ile Ile Glu
835 840 845

Lys Val Lys Cys Ser Leu Glu Ile Thr Leu Lys Glu Lys His Gln Gln
850 855 860

Glu Leu Gln Ser Leu Lys Ile Glu Tyr Glu Cys Lys Leu Asp Ala Leu
865 870 875 880

Val Lys Asp Ser Glu Glu Asn Val Asn Lys Ile Leu Lys Leu Lys Glu
885 890 895

Asn Leu Val Ser Leu Glu Glu Ala Leu Gln Asn Lys Asp Asn Glu Phe
900 905 910

Thr Ser Ile Lys His Glu Lys Asp Ala Ile Val Cys Val Gln Gln Glu
915 920 925

Lys Asp Gln Lys Leu Leu Glu Met Glu Lys Ile Met His Thr Gln His
930 935 940

Cys Glu Ile Lys Glu Leu Lys Gln Ser Arg Glu Met Ala Leu Glu Asp
945 950 955 960

Leu Lys Lys Leu His Asp Glu Lys Ile Glu Ser Leu Arg Ala Glu Phe
965 970 975

Gln Cys Leu Glu Glu Asn His Leu Lys Glu Leu Glu Asp Thr Leu His
980 985 990

Ile Arg His Thr Gln Glu Phe Glu Lys Val Met Thr Asp His Asn Met
995 1000 1005

Ser Leu Glu Lys Leu Lys Lys Glu Asn Gln Gln Arg Ile Asp Gln

16 / 61

1010	1015	1020
Met Leu Glu Ser His Ala Ser Thr Ile Gln Glu Lys Glu Gln Gln 1025 1030 1035		
Leu Gln Glu Leu Lys Leu Lys Val Ser Asp Leu Ser Asp Met Arg 1040 1045 1050		
Cys Lys Leu Glu Val Glu Leu Ala Leu Lys Glu Ala Glu Thr Asp 1055 1060 1065		
Glu Ile Lys Ile Leu Leu Glu Glu Ser Arg Thr Gln Gln Lys Glu 1070 1075 1080		
Met Leu Lys Ser Leu Leu Glu Gln Glu Thr Glu Asn Leu Arg Thr 1085 1090 1095		
Glu Ile Ser Lys Leu Asn Gln Lys Ile His Asp Asn Asn Glu Ser 1100 1105 1110		
Tyr Gln Val Gly Leu Ser Glu Leu Arg Ala Leu Met Thr Ile Glu 1115 1120 1125		
Lys Asp Gln Cys Ile Ser Glu Leu Ile Ser Arg His Glu Glu Glu 1130 1135 1140		
Ser Asn Ile Leu Lys Ala Glu Leu Asp Asn Val Thr Ser Leu His 1145 1150 1155		
Arg Gln Ala Tyr Glu Ile Glu Lys Lys Leu Lys Glu Gln Ile Val 1160 1165 1170		
Glu Leu Gln Thr Arg Leu Asn Ser Glu Leu Ser Ala Leu Glu Lys 1175 1180 1185		

17 / 61

Gln Lys Asp Glu Lys Ile Thr Gln Gln Glu Glu Lys Tyr Glu Ala
1190 1195 1200

Leu Ile Gln Asn Leu Glu Lys Asp Lys Glu Arg Leu Val Lys Asn
1205 1210 1215

His Glu Gln Asp Lys Glu His Leu Ile Gln Glu Leu Asn Phe Glu
1220 1225 1230

Lys Asn Lys Ala Val Gln Thr Ala Leu Asp Glu Phe Lys Val Glu
1235 1240 1245

Arg Glu Leu Val Glu Lys Glu Leu Leu Glu Lys Val Lys His Leu
1250 1255 1260

Glu Asn Gln Ile Ala Lys Thr Pro Ala Phe Glu Ser Ala Arg Glu
1265 1270 1275

Asp Ser Ser Ser Leu Val Ala Glu Leu Gln Glu Lys Leu Gln Glu
1280 1285 1290

Glu Lys Ala Lys Phe Leu Glu Gln Leu Glu Glu Gln Glu Lys Arg
1295 1300 1305

Lys Asn Glu Glu Met Gln Asn Val Arg Thr Ser Leu Ile Ala Glu
1310 1315 1320

Gln Gln Thr Asn Phe Asn Thr Val Leu Thr Arg Glu Lys Met Arg
1325 1330 1335

Lys Glu Asn Ile Ile Asn Asp Leu Ser Asp Lys Leu Lys Ser Thr
1340 1345 1350

Met Gln Gln Gln Glu Arg Asp Lys Asp Leu Ile Glu Ser Leu Ser
1355 1360 1365

18 / 61

Glu Asp Arg Ala Arg Leu Leu Glu Glu Lys Lys Gln Leu Glu Glu
1370 1375 1380

Glu Val Ser Lys Leu Arg Thr Ser Ser Phe Leu Ser Ser Ala Pro
1385 1390 1395

Val Ala Ala Ala Pro Glu Leu Tyr Gly Ala Cys Ala Pro Glu Leu
1400 1405 1410

Pro Gly Glu Pro Glu Arg Ser Val Met Glu Thr Ala Asp Glu Gly
1415 1420 1425

Arg Leu Asp Ser Ala Met Glu Thr Ser Met Met Ser Val Gln Glu
1430 1435 1440

Asn Met Leu Ser Glu Glu Lys Gln Arg Ile Met Leu Leu Glu Arg
1445 1450 1455

Thr Leu Gln Leu Lys Glu Glu Glu Asn Lys Arg Leu Asn Gln Arg
1460 1465 1470

Leu Met Ser Gln Ser Leu Ser Ser Val Ser Ser Arg His Ser Glu
1475 1480 1485

Lys Ile Ala Ile Arg Asp Phe Gln Val Gly Asp Leu Val Leu Ile
1490 1495 1500

Ile Leu Asp Glu Arg His Asp Asn Tyr Val Leu Phe Thr Val Ser
1505 1510 1515

Pro Thr Leu Tyr Phe Leu His Ser Glu Ser Leu Pro Ala Leu Asp
1520 1525 1530

Leu Lys Pro Gly Glu Gly Ala Ser Gly Ala Ser Arg Arg Pro Trp
1535 1540 1545

19 / 61

Val Leu Gly Lys Val Met Glu Lys Glu Tyr Cys Gln Ala Lys Lys
 1550 1555 1560

Ala Gln Asn Arg Phe Lys Val Pro Leu Gly Thr Lys Phe Tyr Arg
 1565 1570 1575

Val Lys Ala Val Ser Trp Asn Lys Lys Val
 1580 1585

<210> 3
 <211> 6636
 <212> DNA
 <213> Unknown

<220>
 <223> human RB1CC1 gene

<400> 3
 gtcgacaata acaaaccaag ccgcgggcgggt gtcgcggggcc ctgccgagcc ctggcggttg 60
 ootcagaatc cccagtcgc ctggggccct cggctctgac aggcgcgggc cttctgtccc 120
 cgggccccag acccagagcc gaggggcctg ctgcgctcct tgtccgcccg gaaccctccc 180
 tgccctcctag agttgggggc cgcggcgggc gggcgcccg gacgcgggog gttgtgtcgg 240
 cttagcggtg ccgaatgggc ggttggtaac cgtgcgcgag gactaggcgg cggcggaaga 300
 tggcgccggg ggtcgtggc tctgctgtg ccgcgggoga aggaggaggc gttgcgggtt 360
 ttctgagttt aaccagtaat gccattcagt tgccaatcto aagcaaagca aacataagcc 420
 agttttaatc tactttttaa gaaaagtggg agtccttttc acagtgcctg acgtaactgt 480
 atcagagggt gaggtataag ctacacagaat tcagataaat catcatgaag ttatatgtat 540
 ttctggttaa cactggaact actotaacat ttgacactga acttacagtg caaactgtgg 600
 cagaccttaa gcatgccatt caaagcaaat acaagattgc tattcaaac caggtgctgg 660
 tggatcaatgg aggagaatgc atggctgcag atcgaagagt gtgtacctac agtgctggga 720

20 / 61

oggatacaaa tocaattttt cttttaaca aagaatgat cttatgogat cgtccacctg 780
ctattcctaa aactaccttt tcgacagaaa atgacatgga aataaaagtt gaagaatctc 840
ttatgatgcc tgcagttttt catactgttg cttcaaggac acagcttgca ttggaaatgt 900
atgaagttgc caagaaactt tgttttttt gtgaaggctt tgtacatgat gaacatcttc 960
aacaccaagg ctgggtgca atcatggcca acctggagga ctgttcaa tcataccaa 1020
agctactttt caagttigaa agtatttatt caaattatct gcagtccata gaagacatca 1080
agttaaaact tactcattta ggaactgcag tticagtaat ggccaagatt ccaactgttg 1140
agtgcctaac cagacatagt tacagagaat gtttggaag actggattct ttacctgaac 1200
atgaagactc agaaaaagct gagacgaaa gatccactga actgggtgct tctcctgata 1260
tgcctagaac aactaacgaa totttgtaa cctcatttcc caagtcagtg gaacatgtgt 1320
ccccagatac cgcagatgct gaaagtggca aagaaattag ggaatottgt caaagtactg 1380
ttcatcagca agatgaaact acgattgaca ctaaagatgg tgatctgcc tttttaatg 1440
tctctttgtt agactggata aatgttcaag atagacctaa tgatgtggaa totttggtca 1500
ggaagtgcct tgattctatg agcaggcttg atccaaggat tattcgacca tttatagcag 1560
aatgccgtca aactattgcc aaacttgata atcagaatat gaaagccatt aaaggactg 1620
aagatcggct ctacgccctg gaccagatga ttgctagctg tggccgactg gtgaatgaac 1680
agaaagagct tgcacaggga ttttagcta atcagaagag agctgaaaac ttaaaggatg 1740
catctgtatt acctgattta tgcctgagtc acgcaaata gttgatgatt atgttgcaaa 1800
atcatagaaa actgttagat attaagcaga agtgtaccac tgccaaacaa gaactagcaa 1860
ataacctaca tgcagactg aagtgtgtt gotttgtaat gottcatgct gatcaagatg 1920
gagagaagtt acaagctttg ctccgcctcg taatagagct gttagaaaga gtcaaaattg 1980
ttgaagctct tagtacagtt cctcagatgt actgcttagc tgttggtgag gttgtaagaa 2040
gaaaaatgtt cataaaacac tacaggaggt gggctggtgc tttagtcaaa gatggaaaga 2100
gattatatga agcagaaaaa tcaaaaaggg aatcctttgg gaaattattt aggaagtctt 2160

ttttaagaaa tegtgtgttt aggggactgg actcctggcc cccctccttt tgtactcaaa 2220
agcctcgaaa gtttgactgt gaacttcag atatttcatt aaaagattta cagtttctgc 2280
aatcattttg tccttcggaa gttcagccat tccctcagggt tcccttaactt tgtgactttg 2340
aacctctaca ccagcatgta cttgtcttac ataatttggg aaaagcagca caaagtttgg 2400
atgaaatgtc acagaccatt acagatctac tgagtgaaca aaaggcatct gtgagccaga 2460
catccccaca gtctgtttct tcaccaagga tggaaagtac agcaggaatt acaactacta 2520
cctcaccgag aactcctcca ccactgaactg ttcaggatcc cttatgtcct gcagtttgtc 2580
ccttagaaga attatctcca gatagtattg atgcacatac gtttgatttt gaaactatto 2640
cccatccaaa catagaacag actattcacc aagtttcttt agacttggat tcattagcag 2700
aaagtcctga atcagatttt atgtotgtctg tgaatgagtt tgtaatagaa gaaaatttgt 2760
cgtctcctaa tccataaagt gatccacaaa gcccagaaat gatggtggaa tcactttatt 2820
catcagttat caatgcgata gacagtagac gaatgcagga tacaaatgta tgttgtaagg 2880
aggattttgg agatcatact tctotgaatg tccagttgga aagatgtaga gttgttgccc 2940
aagactctca cttcagtata caaaccatta aggaagacct ttgccacttt agaacatttg 3000
tacaaaaaga acagtgtgac ttctcaaatt cattaaaatg tacagcagta gaaataagaa 3060
acattattga aaaagtaaaa tgttctotgg aaataacact aaaagaaaa catcaaaaag 3120
aactactgtc tttaaaaaat gaatatgaag gtaaacctga cggactaata aaggaaactg 3180
aagagaatga aaacaaaatt aaaaaatga agggagagtt agtatgcctt gaggagttt 3240
tacaaaataa agataatgaa tttgctttgg ttaaacaatga aaaagaagct gtaatctgcc 3300
tgcagaatga aaaggatcag aagttgttag agatggaaaa tataatgcac tctcaaaatt 3360
gtgaaattaa agaactgaag cagtcacgag aaatagtgtt agaagactta aaaaagctcc 3420
atgttgaaaa tgatgagaag ttacagttat tgagggcaga acttcagtcc ttggagcaaa 3480
gtcatctaaa ggaattagag gacacacttc aggttaggca catacaagag ttgagaagg 3540

22 / 61

ttatgacaga ccacagagtt tctttggagg aattaaaaaa ggaaaatcaa caaataatta 3600
atcaaataca agaattcat gctgaaatta tccaggaaaa agaaaaacag ttacaggaat 3660
taaaactcaa ggtttctgat ttgtcagaca cgagatgcaa gttagagggt gaacttgcgt 3720
tgaaggaagc agaaactgat gaaataaaaa ttttgotgga agaaagcaga gccagcaga 3780
aggagacctt gaaatctctt cttgaacaag agacagaaaa ttgagaaca gaaattagta 3840
aactcaacca aaagattcag gataataatg aaaattatca ggtgggctta gcagagctaa 3900
gaaotttaat gacaattgaa aaagatcagc gtatttcoga gtaattagt agacatgaag 3960
aagaatctaa tataacttaa gctgaattaa acaaagtaac atotttgcat aaccaagcat 4020
ttgaaataga aaaaaacctt aaagaacaaa taattgaact gcagagtaaa ttggattcag 4080
aattgagtcg tottgaaaga caaaaagatg aaaaaattac ccaacaagaa gagaaatacg 4140
aagctattat ccagaacctt gagaaagaca gacaaaaatt ggtcagcagc caggagcaag 4200
acagagaaca gtaattcag aagottaatt gtgaaaaga tgaagctatt cagactgcc 4260
taaaagaatt taaattggag agagaagttg ttgagaaaga gttattagaa aaagttaaac 4320
atottgagaa tcaaatagca aaaagtcctg ccattgactc taccagagga gattcttcaa 4380
gottagtgcg tgaacttcaa gaaaagcttc aggaagaaaa agctaagttt ctagaacaac 4440
ttgaagagca agaaaaaga aagaatgaag aaatgcaaaa tgttcgaaca tctttgattg 4500
cggaacaaca gaccaatttt aacaotgttt taacaagaga gaaaatgaga aaagaaaaca 4560
taataaatga tcttagtgat aagttgaaaa gtacaatgca gcaacaagaa cgggataaag 4620
atttgataga gtcactttct gaagatcgag ctogtttgct tgaggaaaag aaaaagcttg 4680
aagaagaagt cagtaagttg cgcagtagca gttttgttc ttcaccatat gtagctacag 4740
ccccagaact ttatggagct tgtgcacctg aactcccagg tgaatcagat agatccgctg 4800
tggaacagc agatgaagga agagtggatt cagcaatgga gacaagcatg atgtctgtac 4860
aagaaaatat tcatatgttg totgaagaaa aacagcgat aatgctgtta gaacgaacat 4920
tgcaattgaa agaagaagaa aataaacggt taaatcaaag actgatgtct cagagcatgt 4980

23 / 61

ottcagtatc ttcaaggcat tctgaaaaga tagctattag agattttcag gtgggagatt 5040
tggtactcat catcctagac gaacgccatg acaattatgt gttatttact gttagtccta 5100
ctttatattt tctacattca gagtctctac ctgccctgga tctcaaacca ggtgagggtg 5160
cttcaggtgc atctagaaga ccctgggtac ttggaaaagt aatggaaaaa gaatactgtc 5220
aagccaaaaa ggcacaaaac agattttaag ttcccttggg gacaaagttt tacagagtga 5280
aagcogtate atggaataag aaagtataac ttatggacaa aattaatata ttctatgaca 5340
tttttttctg atttgtoctg cagtgtcat tcatcactcc aaaaacagca ggccatcttt 5400
ttatgcaaaa gtcagcgtga caatatactt cactgggtga catcgtttac tttttaactg 5460
gcttcatttt aggaataata aattcatcag aatccttggc tgaattaaaa tggtttttgt 5520
tttttggttt ttttttttac ccagacaact ctagaaatgc ggaccaaact acttcatttt 5580
ctcaaagggc ataccttggt cattgtggct tatgatgagc catattaatt gcoctgttaa 5640
tatacactag cttgaaotta gatgttaa at gttattatta ccagcatttg tccctttgtg 5700
aaatcagtat cagaatactt gcactcttta acacattctt tataaaatgt ataaattatt 5760
cagaactatt taaaataaag aggagtgtta ttgcatgtg ataatcattt tgagtttgcc 5820
tcagtagata ctaaagocaa ttgtttcagt ttttttaaat gccctttgat gtttcaaaaa 5880
aaaaaaggaa ctgtaatttg attgactgat ttaagatca gccataagta atcagcaatc 5940
ttcaaaagca ctttcagtgg attggtcatc tgggttctaa agggaagagt ctgtgtact 6000
aaccatttca aatgcagact caaaccttcc caacatcttt atgactctag aataatcata 6060
ttgatgaaat cgtaattcat ggttgagttt cagaacaaaa gatattcatt gcacattaac 6120
catttagagg tcattttaa at aacaaaatat tgtattgtaa aagaactgta caattttaaa 6180
acaataaaga ttgtaacotg taaatgtgtg tgccctttta agaaggatac atttttaata 6240
tatttgagtg attgctggga agtgtgaaaa tattgttatg tatcatatca aagagaaaca 6300
tgtttattac aaaaatgttc ttttaactata tactatgtaa cagggtaaac agtgttatgt 6360

24 / 61

agaatagaat tgtgtaaact agatotttag agaagttgcc attgagcaaa gttatttaaa 6420
 tgagttagtt gagttggatg agaattgttt gaggtttgtt gctagagaac aataataaaa 6480
 taattctttt tcagaaaata ttttaatttct tcataaaaat aagttaaata tttttttaaa 6540
 tatgtatatc taatagtaca aaatggaata aacatcatag tgtatagaaa actgaatttg 6600
 acaagttaat gaataaatga acaaatgatt tcaaaa 6636

<210> 4
 <211> 6518
 <212> DNA
 <213> Unknown

<220>
 <223> mouse Rb1cc1 gene

<400> 4
 ccgagtcgac aataacaaac cccacggcgg cgcgcaccca gccctgocaa gctctcagtg 60
 cctcggccgg cggactcggg tcccgcgcgc gagccgaggg gccggagcag cggctgcgcc 120
 cgactcccat ccttcgggac ctgcgcgggt actcgggggc tgggcgcoga cggttgtgtc 180
 ggttgccggc gccgcagggg cggttgatag ccgcgcoga gccagggcg gcgcagaaag 240
 atggtgcgga gggcgcgcgc ctgtgttgct gccgcggcg gagggaggcg tcgcggttct 300
 ctgagtttca ccagtaatgc cactcagttg ccaatatcaa gcaagcgcat ataagacaat 360
 tgtaatcttt taagaaaagt agtacttctc ttacagtat ctggcggatc aacaactggag 420
 ggtgaggtgt cagcttcag aaagatcaco atgaagttat atgtgtttct ggtaaacacc 480
 ggaaccacgc tgacatttga cactgagcta actgtgcaaa ctgtggctga tottaagcat 540
 gccattcaaa gcaaatacaa gattgctatt cagcaccagg ttctgggtgt caatggagga 600
 gaatgcatgg ctgcagatcg aagagtgtgt acttacagcg ctgggacgga cacaaatcca 660
 atttttcttt ttaataaaga aatgatotta tgtgaccgtg cacctgctat tctaaagct 720
 accttttcaa cagaaaatga catggaaata aaagttgaag agtctcttat gatgcctgca 780
 gttttccaca ctgttgcttc aaggacacag ctgcagtg aaatgtatga cgttgccaag 840

25 / 61

aagctctgct ctttctgtga agggcttgto catgatgaac atcttcagca ccaaggctgg 900
gctgcaatca tggccaatot ggaggactgt tcaaattcat accaaaaact tcttttcaag 960
tttgaaagta tttattctga ttatcttcaa tccatagaag acatcaagtt aaaacttact 1020
catttaggaa ctgctgtttc agtaatggcc aagattccac tattggagtg cctaaccaga 1080
catagttaca gggaatgttt gggaagaccg gattctttga atgaacatga aggctcagag 1140
aaagctgaga tgaagagatc tactgaactg gtgctctctc ctgatatgcc tagaacaacg 1200
aacacatcct tggtaacctc atttcacaag tcaatggagc atgtagctcc agatcccacc 1260
ggtactgaac gtggcaaaga acttagggaa tcttgtaaaa gtactgtcca gcaagaagaa 1320
gcttcagtgg atgctaaaga cagtgatctg ctttttttta atgtttcttt gtttagactgg 1380
ataaatgttc aagatagacc caatgatgtg gaatctctgg tcaggaagtg ctttgattct 1440
atgagcaggc ttgacccaaa gattattcaa ccatttatgt tagaatgcca tcaaaactatt 1500
gccaaaacttg ataatcagaa tatgaaagcc attaaagggc ttgaagatcg gotgtatgcc 1560
ttggaccaga tgattgctag ctgtagccgg ctggtaaatg aacagaaaga gcttgctcag 1620
ggatttttag ctaatcagat gagagctgaa aacttgaagg atgcatctgt gttacctgat 1680
ctgtgtctga gtoatgcaaa tcaactaatg attatgttgc aaaaccacag aaaactgttg 1740
gatattaaac agaagtgcac cactgccaaa caagagctag caaacaatct ccacgtcaga 1800
ctgaagtggg gttgttttgt gatgcttcat gctgatcaag atggagaaaa actgcaggca 1860
ctgctcggcc ttgtaataga gctgtagaa agagtcagaa ttgttgaggc tcttagtaca 1920
gttcctcaga tgtattgcct agctgttgtt gaggttgtaa gaagaaaaat gttcattaaa 1980
cactacagag agtgggctgg tgcttttagtc aaagacggaa aacaactata tgaagctgaa 2040
aagtcaaaaa gggaatcctt tgggaaatta tttaggaagt cttttttaag aaatogtctg 2100
tttaaaggac tggactcctg gccttcctca tttgtactc agaagcctcg aaaatttgac 2160
tgtgaacttc cagatatatc attaaaagat ttacagtttc ttcaatcatt ttgtccttca 2220

26 / 61

gaagtgcagc cattcctcag ggtccccccta ctttgtgact ttgaacctct acaccagcat 2280
gtacttgccc tacataatit ggtaaaagca gcacaaagtt tggatgaaat gtcacagact 2340
attacagatc tccataatga acaaaaggta tccacaagtc aggcatcccc acagtcagct 2400
gcttctccaa gaatagaaag tacaacaggc attacaacca ctacctcacc aaaaactcct 2460
cctccactaa ctgttcagga caccttatgt cgggcagtgt gtcccttaga agaattatct 2520
ccagatagta tcgatgctca tacatttgat ttcgaaacca totcccatcc aaacacagaa 2580
caacctgttc accaagcttc tatagacttg gattcattag cagaaagccc tgagtctgac 2640
tttatgtctg ctgtgaatga gtttgtgata gaagaaaatt tatcgtctcc aaaccctata 2700
agtgtccac aaagtcaga aatgatggg gagtcactt actcttcagt catcaatgca 2760
atagatagta ggcgtatgca agacacaagt acacgtggaa acgagggctt tggggatcgg 2820
gctgctctac atgtccagct ggagaaatgc agagctgctg cacaagactc tcacaccagt 2880
atacaaacca tcaaggacga totgtgcoat ttcagaacat ttgtacaaaa agaacagtgt 2940
gacttagcaa attattttaa atgtacagct gtgaaataa gaaatattat tgaaaaagta 3000
aaatgttctc tagaaataac actaaaggaa aagcatcagc aagaactcca atctttaaaa 3060
attgagtatg aatgtaaact tgatgctcta gtaaaagaca gtgaagaaaa tgtaataaaa 3120
attttaaaat tgaaagaaaa tttagtatcc ottgaagagg ctttacaaaa taaagacaat 3180
gaattcactt cgattaaaca tgaaaaggat gctattgtct gtgtgcagca agaaaaggat 3240
cagaagttgt tagagatgga aaagataatg catactcaac attgtgaaat taaagaactg 3300
aagcagtcac gagagatggc attagaagac ctgaaaaagc tgcattgatga aaaaatcgag 3360
tcattgagag ctgaatttca gtgcttagaa gaaaatcacc tgaaggaatt agaggacaca 3420
ctgcacatca ggcacacaca ggagtttgag aaagttatga cagaccacaa tatgtctttg 3480
gagaaattaa aaaaagaaaa tcagcaaaga attgaccaga tgctagaatc tcatgcctca 3540
actattcagg aaaaagagca acagctgcag gaggttgaaac tcaaagtttc tgacttgtca 3600
gacatgagat gtaagttaga ggttgaactt gcactaaagg aagcagaaac agatgagata 3660

27 / 61

aagatcttgt tggaagagag cagaacacag cagaaggaaa tgctgaagtc tttacttgaa 3720
caagagaccg aaaacttaag aacagaaata agtaactaa accaaaaaat tcatgataat 3780
aatgagagtt accagggtggg tttgtcagag ttaagagott taatgacaat tgaaaaagat 3840
cagtgcattt cagagttaat cagtagaat gaagaagaat ctaatatact taaggctgaa 3900
ttagacaatg ttacatcttt gcatcgcaa gcatatgaaa tagaaaaaa actgaaagaa 3960
caaatagttg aattgcagac tagattgaac tcagaattga gtgctcttga aaaacagaaa 4020
gatgaaaaa ttaccaaca agaagagaag tatgaagcac ttatocagaa ccttgagaaa 4080
gacaaggaga gactggtcaa gaaccagag caagacaaag aacacttaat tcaggagott 4140
aattttgaaa aaaacaaagc gtgtcaaac gactagatg aatttaagggt ggagagagaa 4200
cttggtgaga aagagttatt agaaaaagtt aaacatcttg agaataaat agccaaaact 4260
cctgcctttg agtcagccag agaagattot tcaagcttag ttgcggaact tcaagagaaa 4320
cttcaagaag aaaaagctaa gttcttgaa caacttgaag aacaagagaa aagaaagaat 4380
gaggaaatgc aaaatgtcag aacctctttg attgtgagc agcagaccaa ctttaacaca 4440
gtottaacaa gagagaaaat gaggaaagaa aacataataa atgatcttag tgataagcta 4500
aaaagtacaa tgcagcagca agagcgggat aaagattiga tagagtcgct ctotgaggac 4560
cgagctcgtt tgcttgaaga gaagaagcag cttgaagagg aagttagtaa actccgact 4620
agcagttttc tttctcagc acctgtggct gcagcccag agctctatgg tgcgtgtgca 4680
cctgagctcc caggggagcc agagagatca gtcatggaga cggcagatga aggaagactg 4740
gattccgcaa tggagacaag catgatgtot gtccaagaaa acatgttatc tgaagagaag 4800
cagaggatca tgctcctaga acggacattg cagttgaaag aagaagaaaa caagcggtta 4860
aatcaaagac tgatgtctoa gagtttgtoc tcagtctctt caaggcattc tgaaaaata 4920
gccattagag attttcaggt gggagatttg gttctcatca tcttagatga gcggcacgac 4980
aattatgtat tgtttactgt tagtctact ttatattttc tgcaactcaga gtctcttct 5040

28 / 61

gcoctggatc tcaaaccagg tgagggagct tcaggtgcac ctagaagacc ctgggtcctt 5100
gggaaagtaa tggaaaagga atactgtcaa gccaaaaagg cacaaaacag atttaaagtt 5160
cctttgggga caaagtttta cagagtgaac gctgtgtcat ggaataagaa agtatagcaa 5220
cagaagaaat ctctacatct cataccattt ttgatttgc ctocagtgt gataaactac 5280
tctaaaaaca gctggccatt gttgggtttt ttttgttgt ttgtttgtt gttgtttt 5340
acaaaagtca acataacaat atacttcatt ggtggactgc acttacctt taagtggcta 5400
catotttaga acaataaatt tattaataat ctgggtgaa tcaaatggt tttgtttgt 5460
ttccacccaa ataactagaa attcggacca aaatagatgt tttccaagg cagagcctgc 5520
actgtggctt gtgactagcc tcattagtgt cctgttaata aacattagct gaatagtac 5580
cagtgttgtt accagcattt gtctcttgt gaattcaaga gtctctgcac tcttaacat 5640
gttctttata aaatgtataa acccttccaa actatttaaa gaggagtgt attgcatgca 5700
gataatcata attttgagtt tgctcagaa gactactaaa gcaaattgt tcatttttt 5760
ttaaaaaat gcoctttaat gttcaaaaa aaaataacag tgtaattga ctgacttta 5820
gatcagccat aaataatgag cagtcttcaa aagcacttt cacacagatc atctgggctc 5880
caggaggaa gactgtgtc cactgatgtt ttaagtga ggactcactc aaacctctca 5940
gcatottagg actgtttcaa gtaatcatat tgatgaactc gtaattcatg gttgacctc 6000
agaagaagat attcattgta tattaacatt tagaggatc ttaataaca aaagtctgta 6060
ttgtaaagga cctgtacaat ttaagacaa taaagaattg aaagtgtaaa tgtgtgtgcc 6120
ttttaaaggt tacattttta atatattgct tgatttctgg gaaaggtgaa aaaaatgttc 6180
tgtatcaaag agaaacctgt ttattaaaa atgtgtttg tatctatgt aacagggtga 6240
agtgtgttc tgtggaacag aacctgtaa actcaaggtt taaaagctgg cactgaacaa 6300
agatattgaa gtagctaggc tagttgattg gaaagattt cttcagggtt gttgttagca 6360
gtaataaatg attcttttc agaaatattt aatttctcca taaaaataag ttgatattt 6420
ttataaatat gtaatctaata agaatgaaaa tggaataaac atagtgtata gaatacctaa 6480

29 / 61

ttcaaaaaca tattaatgaa taaaogaaca aatgatta

6518

<210> 5
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> artificially synthesized primer sequence called CC1-S1

<400> 5
gacgtaactg tatcagaggg

20

<210> 6
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> artificially synthesized primer sequence called CC1-S2

<400> 6
tcagagggtg aggtataagc

20

<210> 7
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> artificially synthesized primer sequence called CC1-S3

<400> 7
atcatcatga agttatatgt atttctgg

28

<210> 8
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> artificially synthesized primer sequence called CC1-ASP2

30 / 61

<400> 8
ttggccatta ctgaaactgc a

21

<210> 9
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> artificially synthesized primer sequence called CC1-S4

<400> 9
tgtggaatct ttggtcagga

20

<210> 10
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> artificially synthesized primer sequence called CC1-ASP1

<400> 10
taatccttgg atcaagcctg c

21

<210> 11
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> artificially synthesized primer sequence called CC1-S5

<400> 11
tgtaccactg ccaaacaaga a

21

<210> 12
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

31 / 61

<223> artificially synthesized primer sequence called CC1-S6

<400> 12

ottcggaagt tcagccattc

20

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized primer sequence called CC1-S6R

<400> 13

tccatccttg gtgaagaagc

20

<210> 14

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized primer sequence called CC1-S7

<400> 14

tcccatcca aacatagaac a

21

<210> 15

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized primer sequence called CC1-S8

<400> 15

aaggaagacc ttgocactt t

21

<210> 16

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

32 / 61

<220>

<223> artificially synthesized primer sequence called CC1-S9

<400> 16

gaactgaago agtcacgaga aa

22

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized primer sequence called CC1-S10

<400> 17

ttgtcagaca cgagatgcaa

20

<210> 18

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized primer sequence called CC1-S11

<400> 18

aaattatcag gtgggcttag ca

22

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized primer sequence called CC1-S

<400> 19

ccaggagcaa gacagagaac

20

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

38 / 61

<220>

<223> artificially synthesized primer sequence called CC1-AS

<400> 20

cgagctcgat cttcagaaag

20

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized primer sequence called CC1-AS5

<400> 21

tgcttgtctc cattgctgaa

20

<210> 22

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized primer sequence called CC1-AS4

<400> 22

ccaaatctcc cacctgaaaa

20

<210> 23

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized primer sequence called HCC22INTS

<400> 23

ctagacgaac gocatgacaa

20

<210> 24

<211> 23

<212> DNA

34 / 61

<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized primer sequence called HCC22INTAS

<400> 24

tggottgaca gtattotttt tcc

23

<210> 25

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized primer sequence called CC1-AS2

<400> 25

tgagcactgc aggacaaatc a

21

<210> 26

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized primer sequence called CC1-AS1

<400> 26

tgatgaatga gcactgcagg a

21

<210> 27

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized primer sequence called RB1CC-RS1

<400> 27

cctccctgcc tcctagagtt

20

<210> 28

<211> 20

35 / 61

<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> artificially synthesized primer sequence called RB1CC-R4

<400> 28
tagtctctcgg cagcggttac 20

<210> 29
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> artificially synthesized primer sequence called RB1CC-R3

<400> 29
aaactcagaa aaccggcaac 20

<210> 30
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> artificially synthesized primer sequence called RB1CC-R2

<400> 30
tgccacagtt tgcaactgtaa g 21

<210> 31
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> artificially synthesized primer sequence called RB1CC-R1

<400> 31
tttccaatgc aagotgtgtc 20

<210> 32

36 / 61

<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized primer sequence called RB1CC-RS2

<400> 32

gagtgaagc cgtatcatgg a

21

<210> 33
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized primer sequence called RB1CC-RS3

<400> 33

aatgcggacc aaactacttc a

21

<210> 34
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized primer sequence called on RB1CC-RS4

<400> 34

tcagtggatt ggtcatctgg

20

<210> 35
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized primer sequence called RB1CC-RS5

<400> 35

tgattgctgg gaagtgtgaa

20

37 / 61

<210> 36
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized primer sequence called RB1CC-RS6

<400> 36
gagaattgtt tgaggtttgt tgc

23

<210> 37
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized primer sequence called RB1CC-R5

<400> 37
ttgctcaatg gcaacttctc

20

<210> 38
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized primer sequence called MMK3-1-S

<400> 38
gggtgaggta taagtcaca gaa

23

<210> 39
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized primer sequence called MMK3-2-S

<400> 39
tcttatgtga togtccacct g

21

38 / 61

<210> 40
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized primer sequence called MMK3-2-AS

<400> 40

caaaggattc cctttttgat ttt

23

<210> 41
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized primer sequence called MMK6-2-S

<400> 41

gctaatacaga agagagctga aaactt

26

<210> 42
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized primer sequence called MMK1-1-S

<400> 42

gatggtgac tgccctttt

20

<210> 43
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized primer sequence called MMK1-2-S

<400> 43

taagcatgcc attcaaagca

20

39 / 61

<210> 44
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized primer sequence called MMK15-1-S

<400> 44
tttctttata cagggaagtc ttt

23

<210> 45
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized primer sequence called MMK15-2-AS

<400> 45
ttttcagaat gccttgaaga t

21

<210> 46
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized primer sequence called MMK31-2-S

<400> 46
aggataccat catcctagac gaa

23

<210> 47
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized primer sequence called MMK31-2-AS

<400> 47

40 / 61

cttaccaccc tcacctggtt

20

<210> 48
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized primer sequence called MMK40-S

<400> 48
ttttgtattt taagtttagg aactgc

26

<210> 49
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized primer sequence called MMK38-S

<400> 49
ataggataca aatocaattt ttc

23

<210> 50
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized primer sequence called MMK31-S

<400> 50
aaaatatagg atacaaatcc aatgaca

27

<210> 51
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized primer sequence called MMK36-S

41 / 61

<400> 51
aaaggatgca tctgtattac ctga

24

<210> 52
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized primer sequence called MMK340-S1

<400> 52
gccaacctgg aggactgtt

19

<210> 53
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized primer sequence called MCC-S1

<400> 53
ggttctotga gtttcaccag taa

23

<210> 54
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized primer sequence called MCC-S2

<400> 54
atcaacactg gaggtgagg

20

<210> 55
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized primer sequence called EcoCC1S3

42 / 61

<400> 55
atcatcatga agttatatgt gtttctgg

28

<210> 56
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized primer sequence called MCC-S7

<400> 56
gatgcctgca gttttocaca

20

<210> 57
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized primer sequence called MCC-S8

<400> 57
acgtggcaaa gaacttaggg

20

<210> 58
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized primer sequence called MCC-AS4

<400> 58
gcttcttctt gctggacagt

20

<210> 59
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

43 / 61

<223> artificially synthesized primer sequence called MCC-S11

<400> 59

ccttgacca gatgattgct

20

<210> 60

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized primer sequence called MCC-S9

<400> 60

gggtccctt actttgtgac t

21

<210> 61

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized primer sequence called MCC-AS8

<400> 61

catccaaact ttgtgctgct

20

<210> 62

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized primer sequence called MCC-S12

<400> 62

tgtgcacaa gacttcaca

20

<210> 63

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

44 / 61

<220>

<223> artificially synthesized primer sequence called MCC-AS6

<400> 63

ggcacagatc gtccttgatg g

21

<210> 64

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized primer sequence called MCC-S13

<400> 64

tgaacttgca ctaaaggaag ca

22

<210> 65

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized primer sequence called MCC-AS7

<400> 65

cagcatttcc ttotgctgtg

20

<210> 66

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized primer sequence called MCC-S14

<400> 66

tgagtgtctt tgaaaaacag aaag

24

<210> 67

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

45 / 61

<220>

<223> artificially synthesized primer sequence called MCC-S15

<400> 67

ttgcggaact tcaagagaaa c

21

<210> 68

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized primer sequence called MIRB1CC-5

<400> 68

ctggaacaac ttgaagaaca agag

24

<210> 69

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized primer sequence called MIRB1CC-3

<400> 69

acgagctcgg tcctcagaga

20

<210> 70

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized primer sequence called MCC-S3

<400> 70

tcaggtggga gatttggttc

20

<210> 71

<211> 20

<212> DNA

46 / 61

<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized primer sequence called MCC-AS3

<400> 71

tgccgctcat ctaggatgat

20

<210> 72

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized primer sequence called MCC-AS2

<400> 72

cagcactgga ggacaaatca

20

<210> 73

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized primer sequence called MCC-AS1

<400> 73

agtcacaagc cacagtgcag

20

<210> 74

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized primer sequence called MCC-ASR1

<400> 74

tgctttgaat ggcattgctta

20

<210> 75

<211> 20

47 / 61

<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized primer sequence called MCC-ASR2

<400> 75
cctcacccto cagtgttgat

20

<210> 76
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized primer sequence called MCC-ASR3

<400> 76
cctccgcacc atcttttg

18

<210> 77
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized primer sequence called INTRON1ASR

<400> 77
cagggtcccc gtaggact

18

<210> 78
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized primer sequence called MCC-SR1

<400> 78
tcagggtggga gatttggttc

20

<210> 79

48 / 61

<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> artificially synthesized primer sequence called MCC-SR2

<400> 79
ccagcatttg tcctottgtg 20

<210> 80
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> artificially synthesized primer sequence called MCC3-S3

<400> 80
ttttgagttt gcotcagaag a 21

<210> 81
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> artificially synthesized primer sequence called MCC3-S4

<400> 81
tcggaattca tggttgacct 20

<210> 82
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> artificially synthesized primer sequence called MCC3-AS2

<400> 82
tttcccagaa atcacgcaat 20

49 / 61

<210> 83
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized primer sequence called MCC3-AS13

<400> 83
totttgttca gtgccagctt t

21

<210> 84
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized primer seuqnece called MCC15S

<400> 84
accaggtggg ttgtcagag

20

<210> 85
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized primer sequence called MCC15AS

<400> 85
ottggcgatg caaagatgta

20

<210> 86
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized primer sequence called MCC-3S

<400> 86
acactggagg gtgaggtgtc

20

50 / 61

<210> 87
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized primer sequence called MCC-3AS

<400> 87

gtgtcaaagt tcagcgttgt

20

<210> 88
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized primer sequence called MINT1-S

<400> 88

gacggttgtg tcggttgg

18

<210> 89
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized primer sequence called MINT1-AS

<400> 89

ttggcaactg agtggcatta

20

<210> 90
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized primer sequence called MINT2-S0

<400> 90

tgccactcag ttgccaagta

20

51 / 61

<210> 91
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized primer sequence called MINT2-S

<400> 91
cacagtatct ggoggttaagt ca

22

<210> 92
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized primer sequence called MINT3-AS

<400> 92
cccagcgctg taagtacaca

20

<210> 93
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized primer sequence called MINT4-S

<400> 93
taagcatgcc attcaaagca

20

<210> 94
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized primer sequence called MINT4-AS

<400> 94

52 / 61

caggtgcacg gtcacataag

20

<210> 95
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized primer sequence called MINT5-S

<400> 95
gcagttttcc acaactgttgc

20

<210> 96
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized primer sequence called MINT5-AS

<400> 96
ctccagattg gccatgattg

20

<210> 97
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized primer sequence called MINT6-S

<400> 97
gccaatctgg aggactgttc

20

<210> 98
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized primer sequence called MINT6-AS

53 / 61

<400> 98
agaatccggt cttcccaaac

20

<210> 99
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> artificially synthesized primer sequence called MINT7-S

<400> 99
ccaatgatg tggaatctct g

21

<210> 100
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> artificially synthesized primer sequence called MINT7-AS

<400> 100
agcaatcatc tggtoacaagg

20

<210> 101
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> artificially synthesized primer sequence called MINT8-S

<400> 101
aagatcggct gtatgcctt

19

<210> 102
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> artificially synthesized primer sequence called MINT8-AS

54 / 61

<400> 102
caacagtttt ctgtggtttt gc

22

<210> 103
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized primer sequence called MINT9-S

<400> 103
ggatgcattt gtgttacctg a

21

<210> 104
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized primer sequence called MINT9-AS

<400> 104
gcctgcagtt tttctccatc

20

<210> 105
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized primer sequence called MINT10-S

<400> 105
gtccgcctt gtaatagagc

20

<210> 106
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

55 / 61

<223> artificially synthesized primer sequence called MINT10-AS

<400> 106

ccaaaggatt cccttttga

20

<210> 107

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized primer sequence called MINT11-S

<400> 107

gggctggtgc ttagtcaaa

20

<210> 108

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized primer sequence called MINT11-AS

<400> 108

aaaatgagga aggccaggag

20

<210> 109

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized primer sequence called MINT12-S

<400> 109

actcctggcc ttcctcattt

20

<210> 110

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

56 / 61

<220>

<223> artificially synthesized primer sequence called MINT12-AS

<400> 110

tgaggaatgg ctgcacttct

20

<210> 111

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized primer sequence called MINT13-S

<400> 111

gcctcgaaaa ttgactgtg a

21

<210> 112

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized primer sequence called MINT13-AS

<400> 112

tccaaacttt gtgtgcttt t

21

<210> 113

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized primer sequence called MINT14-S

<400> 113

aaaagcagca caaagtttgg a

21

<210> 114

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

57 / 61

<220>

<223> artificially synthesized primer sequence called MINT14-AS

<400> 114

tggaggagga gtttttggtg

20

<210> 115

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized primer sequence called MINT15-S

<400> 115

ccacgagcaa gacaaagaac

20

<210> 116

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized primer sequence called MINT15-AS

<400> 116

tcgcgaacta agcttgaaga a

21

<210> 117

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized primer sequence called MINT16-S

<400> 117

tgaggaaatg caaaatgtca

20

<210> 118

<211> 20

<212> DNA

58 / 61

<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized primer sequence called MINT16-AS

<400> 118

gctcttgctg ctgcattgta

20

<210> 119

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized primer sequence called MINT17-S

<400> 119

aaagtacaat gcagcagcaa ga

22

<210> 120

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized primer sequence called MINT17-AS

<400> 120

tgctgaggaa agaaaaotgc t

21

<210> 121

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized primer sequence called MINT18-S

<400> 121

agctctatgg tgogtgtgc

19

<210> 122

<211> 21

59 / 61

<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> artificially synthesized primer sequence called MINT18-AS

<400> 122
gagcatgato ctctgcttct c 21

<210> 123
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> artificially synthesized primer sequence called MINT19-S

<400> 123
tctgaagaga agcagaggat ca 22

<210> 124
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> artificially synthesized primer sequence called MINT19-AS

<400> 124
cagtctttga tttaaccgct tg 22

<210> 125
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> artificially synthesized primer sequence called MINT20-S

<400> 125
cattgcagtt gaaagaagaa gaaa 24

<210> 126

60 / 61

<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> artificially synthesized primer sequence called MINT20-AS

<400> 126
tgccttgaag agactgagga c 21

<210> 127
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> artificially synthesized primer sequence called MINT21-S

<400> 127
tctottcaag gcattctgaa aa 22

<210> 128
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> artificially synthesized primer sequence called MINT21-AS

<400> 128
atccagggca ggaagagact 20

<210> 129
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> artificially synthesized primer sequence called MINT22-S

<400> 129
agcggcacga caattatgta 20

61 / 61

<210> 130
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized primer seuqnece called MINT22-AS

<400> 130

ttttccatta ctttccaag ga

22

<210> 131
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized primer seuqnece called MINT23-S

<400> 131

ctgggtcctt gggaaagtaa

20

<210> 132
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized primer seuqnece called MINT23-AS

<400> 132

cagcactgga ggacaaatca

20

特許協力条約に基づく国際出願願書

GP02-1023PCT

原本（出願用） - 印刷日時 2003年01月30日（30. 01. 2003）木曜日 11時53分04秒

VIII-5-1	不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て（規則4.17(v)及び51の2.1(a)(v)）	本国際出願に関し、 茶野 徳宏は、 本国際出願の請求項に記載された対象が以下のように開示されたことを申し立てる。
VIII-5-1 (i)	開示の種類	刊行物
VIII-5-1 (ii)	開示の日付:	2002年02月14日（14. 02. 2002）
VIII-5-1 (iii)	開示の名称:	Oncogene
VIII-5-1 (iv)	開示の場所:	
VIII-5-1 (v)	本申立ては、次の指定国のため になされたものである。:	すべての指定国